



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Proyecto de Innovación y Mejora de la Calidad Docente. Memoria final.

Convocatoria 2015

Nº de proyecto: 221

Del color de los ojos al interior del genoma. Nuevas tecnologías aplicadas a la
educación: una experiencia en la enseñanza de la Genética

Responsable del proyecto: M. Rosario Linacero de la Fuente

Centro: Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Genética

1.- Objetivos propuestos en la presentación del proyecto

En el proyecto se propone el diseño de un sistema que integre los conocimientos adquiridos por los estudiantes en las clases teóricas y las habilidades y destrezas que el alumno debe adquirir para usar las metodologías de la Genética como herramientas transversales, que son aplicables en cualquier ámbito de la Biología y de las Ciencias de la Salud, desde el estudio de la biodiversidad hasta el diagnóstico clínico.

Para ello es necesario integrar los conocimientos del análisis genético en sus diferentes niveles de complejidad. Desde el análisis mendeliano, fundamentalmente abstracto, hasta la genómica que se sirve de técnicas que ahora son básicas en biología molecular como la extracción de ADN y el uso de la PCR. Esta integración no tendría resultados satisfactorios sin el trabajo *in silico*, que contribuye a la generación de conocimiento, mediante el uso de bases de datos y de herramientas bioinformáticas.

El sistema de integración se materializará en unas prácticas de laboratorio, en la que los estudiantes, a lo largo de seis sesiones de tres horas, llevarán a cabo un experimento complejo que se iniciará con el análisis de la herencia de un carácter morfológico (color de ojos) mediante cruzamientos programados en *Drosophila melanogaster* y concluirá con la localización de uno de los genes responsables de ese carácter en el genoma de la especie y del posible cambio que origina el fenotipo mutante. En el desarrollo del experimento, el alumno ha de familiarizarse con el uso de distintas técnicas, unas propias del análisis mendeliano y otras de la genética molecular y la genómica.

Este tipo de práctica es posible gracias al uso de una especie modelo como es *Drosophila melanogaster*. La inmensa cantidad de recursos genéticos que se encuentran a disposición de los investigadores y el hecho de que su genoma esté secuenciado, anotado en su mayor parte y a disposición de la comunidad científica, permite diseñar este tipo de experimentos y analizar los resultados en profundidad para llegar a conocer la modificación genética que subyace en el cambio fenotípico estudiado.

En este contexto, los objetivos propuestos en el proyecto son:

- Cambios en la metodología didáctica que faciliten un aprendizaje más autónomo.
- Potenciar la adquisición de aptitudes relacionadas con la investigación científica: aplicación del método científico, interpretación de resultados, toma de contacto con la experimentación llevada a cabo en un laboratorio.
- Dotar a los alumnos de la capacidad de trabajar en grupo y colaborar como en un equipo científico.
- Proporcionar un amplio número de herramientas metodológicas para abordar la investigación y que pueden resultar útiles también en otros campos de la Biología.
- Generar material didáctico en soporte informático haciendo uso del Campus Virtual para ponerlo a disposición del alumno.
- Fomentar actividades divulgativas, ya sea participando en congresos relacionados con la innovación educativa como difundiendo los contenidos virtuales en plataformas educativas.
- Traducción al inglés del material didáctico para contribuir a su mayor difusión.

2.- Objetivos alcanzados.

Se ha realizado el diseño de una práctica que cubre gran parte de los objetivos mencionados en el apartado anterior.

En este diseño, se ha cambiado a un aprendizaje más autónomo a través de la formulación de un objetivo global y de la continuidad en la realización experimental.

Se ha cambiado el espíritu descriptivo que suelen tener las prácticas de Genética tradicionales por el mismo tipo de abordaje experimental que se sigue en el planteamiento y desarrollo de un trabajo de investigación. En la práctica diseñada, se analizan dos generaciones (F1 y F2) de un cruzamiento entre dos líneas de *Drosophila melanogaster* que difieren en dos caracteres. A la vista de los resultados, teniendo en cuenta los conocimientos teóricos previos de los estudiantes, plantean una hipótesis acerca de la localización de los genes responsables en los cromosomas de la especie y, partiendo de la idea de que la diferencia entre un individuo mutante y otro de fenotipo silvestre reside en la secuencia del gen que codifica el carácter mutado, se obtiene el ADN de los genes mutante y silvestre y, mediante el uso de las bases de datos, se determina su posición en el genoma. Por último, aprenden que la combinación de los resultados de la experimentación propia y de la de otros, recogidos en bases de datos, es imprescindible para el avance del conocimiento.

El diseño teórico de la práctica, su realización experimental en el laboratorio, y el análisis de los resultados que se van obteniendo son lo suficientemente complejos como para estimular la colaboración entre los estudiantes. El planteamiento del trabajo de cada grupo como réplicas del experimento, fomenta la discusión de los resultados de manera conjunta.

En la práctica se han incluido una gran cantidad y diversidad de herramientas, que van desde el análisis mendeliano clásico hasta el uso de las bases de datos para realizar análisis de secuencias *in silico*. Las distintas herramientas metodológicas que se usan con una finalidad determinada en nuestro caso, las utilizarán en otras asignaturas del grado con fines diferentes, lo que contribuye a darle a estas metodologías el carácter transversal que tienen.

Se ha generado un guión con el planteamiento conceptual del trabajo, en el que también se han incluido los protocolos experimentales que los estudiantes van a utilizar en la realización de la práctica. Como es normal en la realización de un experimento, puede que algún paso no salga correctamente. En este caso hipotético, se discutirá con los estudiantes la manera de resolver la situación y se les proporcionará cuanta nueva información sea necesaria para ello. Además, se han individualizado las 6 sesiones de que consta el desarrollo de la práctica para ser explicadas de forma gráfica mediante presentaciones de PowerPoint que, a su vez, contienen enlaces a otros recursos educativos en la red, directamente relacionados con la temática correspondiente a cada sesión. Todos estos recursos estarán a disposición del estudiante en el campus virtual. La intención de los participantes en este proyecto es revisar periódicamente el material generado con el fin de mejorar sus cualidades didácticas a partir de la experiencia con los estudiantes.

El hecho de que las prácticas sean un experimento continuado permite la presentación de los resultados en reuniones científicas estudiantiles, tipo congreso, donde los estudiantes expliquen su trabajo al resto de la comunidad mediante la elaboración de paneles. La intención de los profesores participantes en este proyecto es fomentar

dicha participación, para enseñar a los alumnos cómo elaborar un poster científico y a divulgar los resultados de la investigación para distintos tipos de público.

La traducción al inglés del material generado se irá realizando a medida que se vaya desarrollando la práctica en el segundo semestre de este curso que comienza el día 22 de febrero. Una vez pasado el filtro de su realización con los alumnos, se ajustarán definitivamente las sesiones y se realizarán las traducciones.

3.- Metodología empleada en el proyecto.

3.1.- Reuniones de los miembros del grupo.

- a. Identificación de los problemas que tienen los alumnos de Genética para relacionar la información obtenida mediante el análisis genético clásico (análisis de descendencias) con los resultados de las tecnologías ómicas.
- b. Determinar cuáles han de ser los cambios en la metodología didáctica para resolver dichos problemas.
- c. Diseño de las prácticas definiendo los objetivos docentes, los contenidos y la metodología.
- d. Elaboración del material docente: guiones y protocolos experimentales.

3.2.- Trabajo en el laboratorio

- a. Desarrollo de los protocolos y adecuación de los mismos a la duración de las sesiones prácticas que es de tres horas.
- b. Organización de los espacios docentes de acuerdo al desarrollo de la actividad: puestos de trabajo, número alumnos por equipo, distribución del equipamiento, etc. En este punto ha sido imprescindible la ayuda del personal de administración y servicios adscrito al departamento.

3.3.- Trabajo in silico

- a. Diseño de la actividad que los estudiantes realizarán en las aulas de informática.
- b. Relación entre los resultados obtenidos en el laboratorio y los presentes en las bases de datos.

3.4.- Generación de las presentaciones finales

3.5.- Elaboración del informe final.

4.- Recursos humanos.

Todos los profesores que han participado en el proyecto pertenecen al Departamento de Genética, forman parte de distintos grupos de investigación y están involucrados en la docencia de la Genética, tanto en asignaturas del Grado en Biología, (Genética, Métodos en Biología, Fundamentos de Ingeniería Genética y Genómica, Biología del Desarrollo, Biología Evolutiva, Proyectos y Estudios en Biología, Genética Humana y demografía, Análisis Biológico y Control de Calidad, Cultivos Celulares y Transgénesis, Iniciación a la Investigación, Trabajo de Fin de Grado) como del Grado de Bioquímica (Biología, Laboratorio integrado, Biotecnología de plantas), y en diversos Másteres.

Por otro lado, puesto que cada miembro del proyecto pertenece a un campo de investigación diferente dentro del ámbito de la Genética, su participación enriquece sumamente el proyecto, ya que éste es abordado desde diferentes perspectivas.

Todos los miembros del proyecto han estado involucrados a lo largo de varios años en la docencia práctica de Genética, por lo que participarán en todas las actividades indicadas, enriqueciéndolas con su experiencia personal y profesional.

En el proyecto se ha incorporado el personal de administración y servicios del Departamento, que habitualmente colabora con la docencia práctica, pues su participación es necesaria para el desarrollo de las actividades propuestas.

Responsable:

Linacero de la Fuente, M. Rosario. Directora del Dpto. de Genética.

Profesores:

Julia Rueda Muñoz de San Pedro, Ana Margarita Figueiras Merino, Nieves Cuñado Rodríguez, Manuel Díez Sancho, Tomás Naranjo Pompa, Alicia de la Peña Gómez, Francisco Javier Gallego Rodríguez, María del Pilar de Arana Montes, Mónica Pradillo Orellana, Mónica González Sánchez, Carmen Callejas Hervás, Francisco Javier Espino Nuño, Juan Manuel Vega Melero, Juan Luis Santos Coloma, María Dolores Ochando González y Beatriz Beroiz Remírez.

Personal de Administración y Servicios:

José Barrios Díaz, María del Carmen Moreno Ortiz, Mónica de la Cruz Jiménez.

5.- Desarrollo de las actividades.

- Reunión entre los integrantes del proyecto para el reparto de las diferentes tareas (finales de abril). En esta primera reunión general se han formado los grupos de trabajo que han ido desarrollando los distintos aspectos del proyecto.
- Diseño experimental de las sesiones prácticas (mayo) por parte del grupo encargado.
- Reproducción y puesta a punto de la nueva experimentación (junio-julio). Se ha realizado en el laboratorio de alumnos, que en estas fechas se encuentra libre. La experiencia previa de los participantes en el proyecto ha sido crucial tanto en el diseño como en la puesta a punto del experimento.
- Elaboración del material docente para poner a disposición de los alumnos (guiones y presentaciones). Subida de contenidos al campus virtual (septiembre). La elaboración del material ha ido asociada a las dos etapas de realización del proyecto: en primer lugar se ha elaborado el material donde se describe el experimento y su desarrollo conceptual y, posteriormente, se elaboró el cuaderno de protocolos, una vez probados y adaptados a nuestras condiciones. En estos momentos el material está siendo revisado para depositarlo en el Campus virtual, antes de que empiece el segundo semestre, que es cuando vamos a realizar el experimento con los alumnos.

Anexos

ANÁLISIS GENÉTICO DE CARACTERES MORFOLÓGICOS EN *Drosophila melanogaster*

Introducción

Drosophila melanogaster es una mosca de tamaño pequeño, de 2 ó 3 mm, muy extendida por todo el mundo. Se conoce como mosca de la fruta porque es muy abundante en los lugares donde hay uvas, plátanos y ciruelas, sobre todo cuando están en fermentación ya que, además de los jugos frutales, las propias levaduras que se alimentan de la fruta constituyen una parte importante de su dieta. Por sus características biológicas y genéticas ha sido y es uno de los organismos favoritos de los genetistas. Entre esas características cabe reseñar: ciclo de vida corto (10-11 días a 25°C), producción de un número elevado de descendientes, tamaño pequeño y fácil manejo en el laboratorio. Su genoma es de tamaño reducido y se encuentra secuenciado en su totalidad. Además, tiene un número cromosómico bajo ($2n = 8$) y en las glándulas salivales de las larvas pueden observarse cromosomas politénicos, muy útiles en estudios citogenéticos. Los cuatro cromosomas del complemento haploide se denominan X/Y, 2, 3 y 4. Por otra parte, se dispone de una amplia y variada colección de mutantes cuya identificación es muy sencilla.

La primera parte de la práctica consistirá en un análisis mendeliano clásico de descendencias de cruzamientos. El objetivo será determinar la localización, en los cromosomas sexuales o en los autosomas, de dos loci, cada uno con un par de alelos (normal y mutante), que controlan otros tantos caracteres morfológicos. En la segunda parte de la práctica se llevará a cabo el análisis molecular de uno de los loci estudiados con anterioridad: *white*. Se realizará una extracción de ADN de moscas de cepas silvestres y mutantes *white* para amplificar el correspondiente gen. Posteriormente se secuenciarán las dos variantes y se analizará las diferencias entre ellas. Por último, se llevará a cabo un análisis bioinformático de la región genómica donde se localiza el locus (gen) *white*.

PRIMERA PARTE (DÍAS 1 Y 2): ANÁLISIS MENDELIANO DE CARACTERES MORFOLÓGICOS

Las moscas se cultivan en tubos o botellas de cristal en los que previamente se coloca un medio de cultivo compuesto por levadura, azúcar, agar, sal, ácido propiónico y agua. La puesta de los huevos se realiza en la superficie del medio de cultivo. Si éstos han sido fecundados, eclosionan en un día y de ellos salen unas diminutas larvas blancas que penetran en el medio, alimentándose de la levadura. Las larvas pasan por tres estadios, al final de los cuales salen otra vez a la superficie y trepan por la pared de la botella, donde se fijan y comienzan la fase de pupa. Aproximadamente una semana después emergen los adultos.

Para la observación, clasificación y recuento de las moscas es preciso anestesiarlas con éter (eterización).

Las características que permiten identificar el sexo del adulto son las siguientes:

1.- En los machos, la parte final del abdomen es completamente oscura en la zona dorsal. Además, la parte ventral, donde están situados el pene y el arco genital, es redondeada. En las hembras, la terminación del abdomen es más puntiaguda, la franja oscura dorsal es menos extensa y en la parte ventral está la placa vaginal.

2.- Los machos poseen en el tarso del primer par de patas una estructura compuesta de pelos gruesos y cortos que se denomina "peine sexual". Las hembras carecen de esta estructura.

3.- Las hembras tienen mayor tamaño que los machos.

El fenotipo normal para las partes del cuerpo que varían en los mutantes que se van a manejar es el siguiente:

El color del cuerpo es amarillo pajizo, siendo mucho más oscuro en algunos mutantes (*ebony*) y mucho más claro en otros (*yellow*).

Los ojos son de tamaño grande y forma redondeada. Están compuestos por cientos de omatidios, colocados regularmente en filas y columnas; su superficie es mate y su color rojo oscuro. El mutante *lozenge* presenta menor número de omatidios. Por esta razón, sus ojos son alargados y mucho más pequeños. El mutante *white* es fácilmente diferenciable porque debido a la ausencia de pigmentos tiene la coloración blanca. Por otra parte, el mutante *sepia* (*brown*) que carece de ciertos pigmentos muestra ojos de color marrón.



Todos los mutantes que se van a utilizar en esta práctica son recesivos.

Cuando se hacen cruzamientos entre genotipos diferentes hay que asegurarse de que las hembras sean vírgenes.

Metodología

1. Se observarán a la lupa individuos de líneas silvestres y mutantes para aprender a reconocer fenotipos mutantes y silvestres para distintos caracteres.
2. Una vez familiarizados con el manejo y la observación de las moscas, se procederá a analizar la descendencia de un cruzamiento entre diferentes estirpes parentales homocigóticas, mutantes para uno o más de los caracteres previamente mencionados. En primer lugar se observarán 30 individuos de la F1 y se anotará su fenotipo, referido tanto a su sexo como a los caracteres que se estén considerando.

3. Posteriormente se observará una F2 obtenida a partir de la misma F1 que se estudió con anterioridad. En la F2 se contarán 250 individuos, anotándose el número correspondiente a cada clase fenotípica en la misma tabla.
4. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las tres generaciones, se determinará el tipo de herencia, autosómica o ligada al sexo, que corresponde a cada carácter y se averiguará si los loci implicados se comportan como ligados o son independientes.

Tabla χ^2

GRADOS DE LIBERTAD	Probabilidad		
	0,05	0,01	0,001
1	3,84	6,64	10,83
2	5,99	9,21	13,82
3	7,82	11,34	16,27
4	9,49	13,28	18,47
5	11,07	15,09	20,52
6	12,59	16,81	22,46
7	14,07	18,48	24,32
8	15,51	20,09	26,12
9	16,92	21,67	27,88
10	18,31	23,21	29,59

SEGUNDA PARTE (DÍAS 3, 4, 5 Y 6): ANÁLISIS GENÓMICO DEL GEN *WHITE*

A partir de este momento nos centraremos en el análisis molecular del gen *white*. Se llevará a cabo la secuenciación de una parte del citado gen tanto en la cepa silvestre (ojos rojos) como en la cepa *white* (ojos blancos). Se analizarán las diferencias existentes en ambos alelos para poder deducir la razón por la que las moscas *white* no tienen pigmentación en el ojo. En primer lugar será preciso realizar una extracción del ADN de ambas cepas para amplificar por PCR el gen que será posteriormente secuenciado. Por último, se analizará la secuencia con los programas informáticos adecuados.

TERCER DÍA: Extracción de ADN de *Drosophila melanogaster*

Material: 15 individuos con fenotipo *white*, ojos blancos, en un eppendorf y otros 15 individuos con fenotipo silvestre en otro. Cada grupo realizará la extracción de una de las cepas.

Metodología

1. Añadir 200 μ l del tampón A (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; EDTA 100 mM, pH 8; NaCl 100 mM; SDS 0,5%). Homogeneizar en hielo.
2. Añadir otros 200 μ l del tampón A. Acabar de homogeneizar en hielo.
3. Incubar 20-30 min a 65°C.

4. Añadir 800 µl de solución Li Cl/K acetato. Mezclar bien invirtiendo varias veces el tubo.
5. Centrifugar 15 min a la máxima velocidad (12.000-13.000 rpm). Pasar 900 µl de sobrenadante a un eppendorf limpio con **cuidado de no arrastrar nada del sedimento**. Si es necesario, volver a centrifugar.
6. Añadir 600 µl de isopropanol. Mezclar bien invirtiendo varias veces el tubo.
7. Centrifugar 15 min a 13.000 rpm. Eliminar el sobrenadante volcando el tubo **sin perder de vista el precipitado**.
8. Lavar con 500 µl etanol al 70% frío.
9. Centrifugar 5 min a máxima velocidad. Eliminar el sobrenadante aspirando con punta amarilla **con cuidado de no aspirar el sedimento**. Dejar evaporar las últimas trazas de etanol a temperatura ambiente con el tubo abierto.
10. Añadir 30 µl de H₂O.

CUARTO DÍA: Valoración del ADN y amplificación mediante PCR de un fragmento del gen *white*

Es preciso analizar el rendimiento y la calidad del ADN obtenido. Esta valoración se lleva a cabo mediante espectrofotometría.

Metodología

En primer lugar se resuspenderá con micropipeta la solución presente en los tubos para acabar de disolver el ADN.

Espectrofotometría

1. Encender el espectrofotómetro con antelación, ya que requiere que las lámparas estén calientes antes de su utilización.
2. En una cubeta se prepara el blanco con agua destilada.
3. Tomar 10 µl del ADN en estudio y diluirlo en 990 µl de agua. Se coloca la solución de ADN en la cubeta de cuarzo.
4. Realizar la medición a 260 nm y a 280 nm.
5. Calcular tanto la concentración de ADN en las muestras (µg/ml) como la cantidad total de ADN extraído (µg). Debe tenerse en cuenta que una OD (Densidad Óptica), medida a 260 nm, corresponde a 50 µg/ml de ADN de doble cadena. La proporción de la lectura a 260 y a 280 nm (260/280) proporciona una estimación de la pureza del ácido nucleico. Las preparaciones puras de ADN tienen una relación de absorbancias 260/280 de 1,8.
6. Dejar las muestras a una concentración de 200 ng/µl añadiendo la cantidad necesaria de agua destilada y estéril.

Amplificación de un fragmento del gen *white* mediante PCR

1. Preparar la mezcla maestra de la reacción de amplificación:

Componentes	Cantidades por tubo	Cantidades por grupo
* <i>Master mix</i> (2x)	10 μ l (1x)	200 μ l
cebador P1 (5 μ M)	1 μ l (0,25 μ M)	20 μ l
cebador P2 (5 μ M)	1 μ l (0,25 μ M)	20 μ l
cebador P3 (5 μ M)	1 μ l (0,25 μ M)	20 μ l

*La *master mix* contiene tampón de reacción, $MgCl_2$, los diferentes dNTP y ADN polimerasa.

2. Se mezclan bien todos los componentes y se reparten 13 μ l por cada tubo.
3. Cada equipo añade 7 μ l de ADN molde (200 ng/ μ l).
4. Introducir los tubos en el termociclador con el siguiente programa:

Pasos del programa	Nº de ciclos	Temperatura	Duración
	1	94°C	5 min
Desnaturalización		94°C	30 seg
Hibridación	35	60°C	1 min
Extensión		72°C	1 min
Extensión final	1	72°C	10 min
Conservación	1	4°C	∞

Preparación de un gel de agarosa al 1,5 % (p/v) en tampón TAE

1. Pesar la cantidad necesaria de agarosa para preparar un gel de 35 ml al 1,5 % (p/v).
2. Mezclar la agarosa con 35 ml en tampón TAE (Tris, acético y EDTA).
3. Fundir en el microondas la solución de agarosa, evitando que hierva.
4. Sellar los bordes de la bandeja con cinta adhesiva y poner los peines.
5. Cuando la solución de agarosa haya alcanzado una temperatura soportable por la mano agregar 35 μ l de SYBR Green (dilución final de la solución comercial 1:10.000).
6. Servir el gel en la bandeja cuidando que no queden burbujas y que no se muevan los peines.
7. Esperar a que la solución gelifique completamente.

QUINTO DÍA: Electroforesis de la PCR

Electroforesis en gel de agarosa del producto de la PCR

1. Se preparan las muestras para la electroforesis en un tubo eppendorf: 8 µl del producto de PCR al que se añaden 2 µl de tampón de carga 5x.
2. Se carga todo el volumen (10 µl) en el gel de agarosa. Simultáneamente a las muestras se cargará un marcador de peso molecular.
3. Se desarrolla la electroforesis a 80 V durante 45-60 minutos.
4. Se fotodocumenta el resultado de la electroforesis en un transiluminador de luz UV.

El volumen restante de la PCR se puede enviar a la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid para su secuenciación. La secuencia del fragmento del gen *white* se determina en usando el método de Sanger.

El resultado de la secuenciación se recibirá posteriormente por correo electrónico, descargándose un archivo que contiene un electroferograma con extensión Ab1. Los archivos Ab1 pueden abrirse con diversos programas de análisis de secuencias o con visores gratuitos.

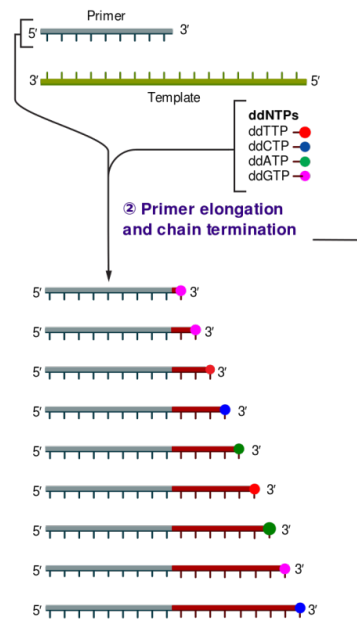
SEXTO DÍA: Análisis de la secuencia del gen *white* y su localización en el genoma de *Drosophila melanogaster*

El análisis más fino de la estructura de un ADN consiste en primer lugar en la determinación de su secuencia. Uno de los procedimientos más utilizados para su determinación es el método de Sanger, también conocido como método enzimático o de terminación de cadena.

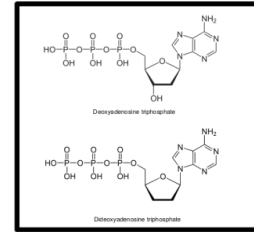
Se realiza una mezcla de reacción en la que se añade: el ADN problema, un oligonucleótido específico, una ADN polimerasa, los cuatro nucleótidos trifosfato (dNTP) y los cuatro didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP). Estos ddNTP son nucleótidos que carecen el residuo hidroxilo en la posición 3' de la desoxirribosa. Estos nucleótidos se pueden incorporar a la cadena nascente de ADN a partir del residuo fosfato en 5' pero, como carecen del grupo -OH en 3', el siguiente nucleótido no se puede unir a ellos, originándose así la terminación de la cadena. Los ddNTP tienen un marcaje fluorescente (cada uno con un fluorocromo diferente). De este modo se puede automatizar el método en un equipo de secuenciación, de forma que se leen, mediante un lector láser, las hélices marcadas.

① Reaction mixture

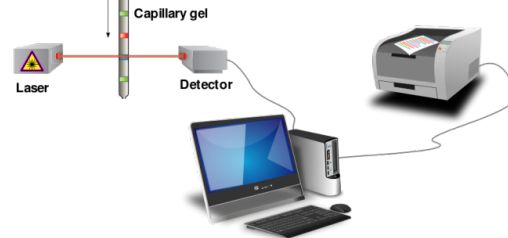
- ▶ Primer and DNA template ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouorochromes ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



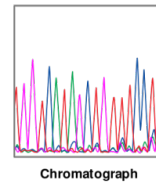
② Primer elongation and chain termination



③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments

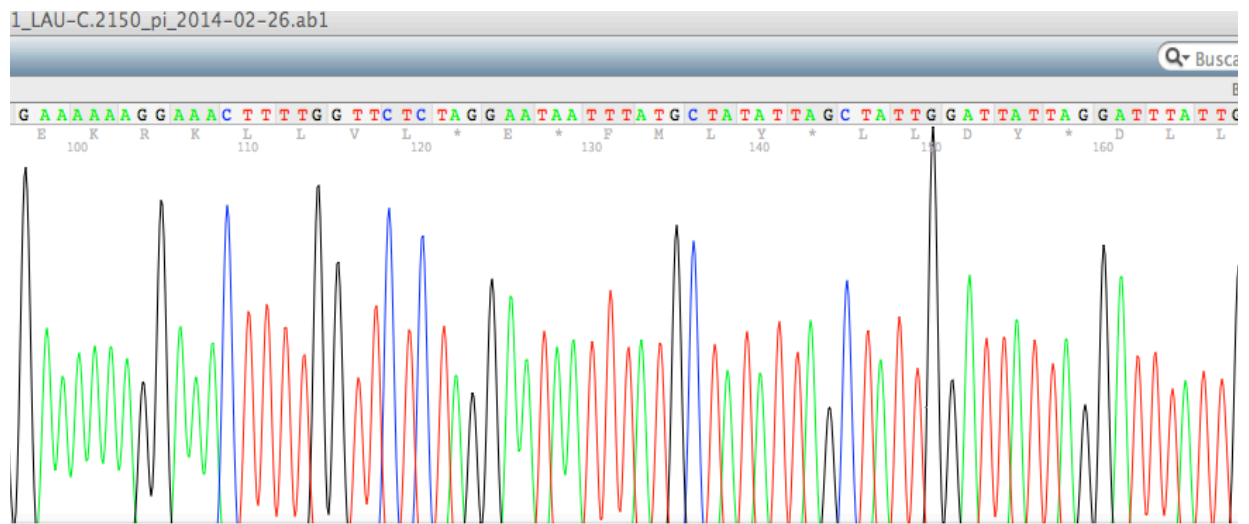


④ Laser detection of flouorochromes and computational sequence analysis



Metodología

1. La secuenciación, realizada por la Unidad de Genómica de la UCM, se lleva a cabo empleando uno de los cebadores utilizados en la PCR. El resultado se muestra mediante un electroferograma en formato Ab1 que se analizará empleando el programa *Chromas Lite*. A partir del electroferograma se obtiene la secuencia de nucleótidos.



En primer lugar, se editará la secuencia obtenida a partir de las moscas de la cepa silvestre (con ojos rojos):

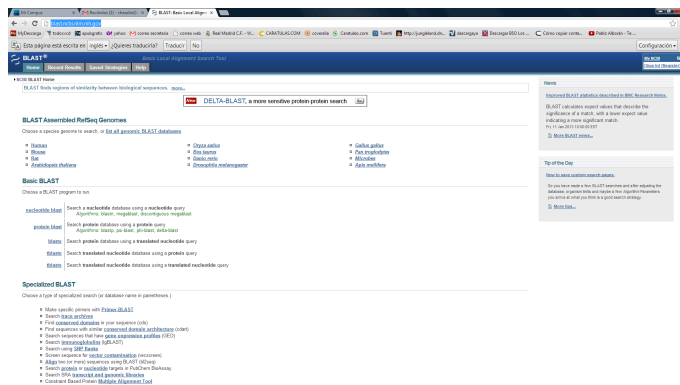
a) Se revisará la secuencia porque en algunas ocasiones se producen fallos al asignar las bases.

b) A continuación se procederá a identificar la secuencia de los cebadores empleados en la PCR (P1: GTGCAAAGGTGGTCAATTT, P3: GAGAGGAGTTTTGGCACAGC). Es importante recordar la polaridad de las hebras para localizar las secuencias de esos cebadores.

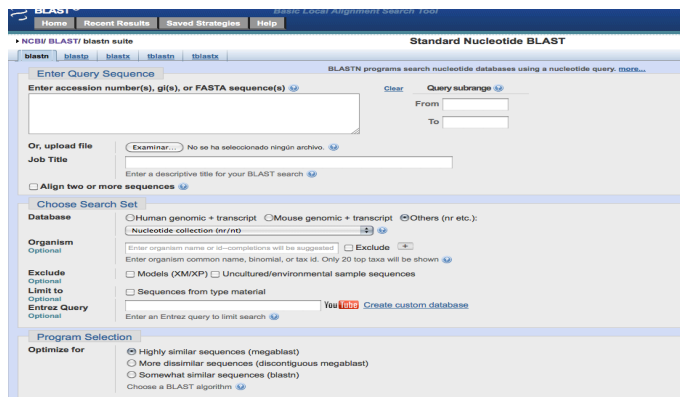
2. Una vez editada la secuencia se lleva a cabo una búsqueda en las bases de datos utilizando el programa *blastn* o *megablast* en la página del NCBI.

a) Ir al programa *BLAST* desde la página del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

b) Elegir la opción *nucleotide blastn*.



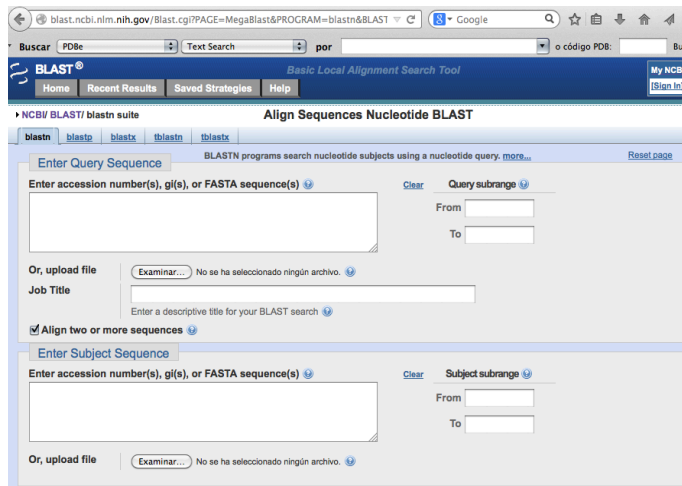
c) Introducir la secuencia problema (*query*), usando la opción de copiar y pegar.



d) En el cuadro *Database* seleccionar *Nucleotide collection*.

e) Determinar si los resultados son los esperados.

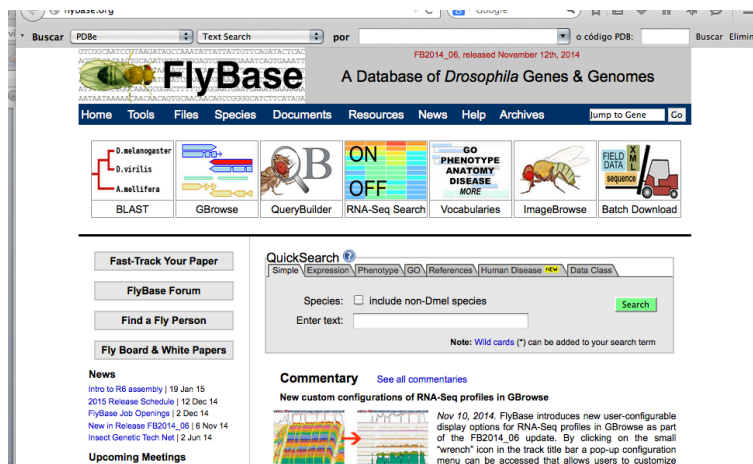
3. Alineamiento de las secuencias de las dos cepas de moscas (silvestre y *white*) con el programa *Align* del NCBI (*bl2seq*). Discutir los resultados.



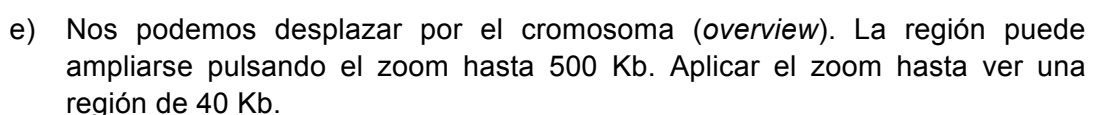
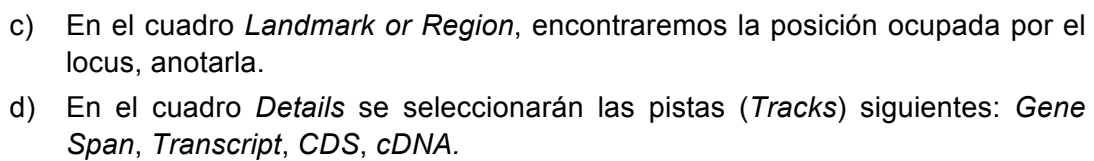
4. Análisis de genomas. Localización de la secuencia obtenida en el genoma de *Drosophila melanogaster*.

En primer lugar, el profesor mostrará cómo utilizar *GBrowse* utilizando la secuencia de ADN obtenida para el locus *white* en *Drosophila melanogaster*. Una vez localizada la secuencia del gen *white* se buscará la posición ocupada por la secuencia del locus *yellow*. Finalmente se relacionará la distancia física entre ambos loci, medida en pares de bases, con la distancia genética estimada a partir de la frecuencia de recombinación.

a) Ir a la aplicación *GBrowse* desde la página *FlyBase* (<http://flybase.org/>).



b) Iniciar la búsqueda por símbolo genético. Buscaremos en primer lugar el gen *white* (w).



- f) Buscar la localización de los loci *yellow* (y) y *lozenge* (lz).
- g) En el cuadro *Landmark or Region*, encontraremos la posición ocupada por cada locus, anotarla.
- h) Dibujar un mapa en el que figuren para los tres loci: su posición relativa en el cromosoma X, sus distancias físicas (Mpb), sus distancias genéticas y el sentido de su transcripción.
- i) Comparar la distancia física con la obtenida mediante análisis de descendencias.

Análisis genético de caracteres morfológicos en *Drosophila*

- Días 1 y 2: Problema de moscas

Análisis genómico del gen *white*

- Día 3: Extracción DNA
- Día 4: Valoración DNA y PCR
- Día 5: Visualización producto de PCR
- Día 6: Editar secuencia, comparar los dos alelos y localizar en el genoma



Genética UCM 2016

Problemas:

- ♀ *white* (*w*) x ♂ *ebony* (*e*) F1 (♀ ≠ ♂) y F2 (♀ = ♂)
- ♀ *ebony* (*e*) x ♂ *lozenge* (*lz*) F1 (♀ = ♂) y F2 (♀ ≠ ♂)
- ♀ *white* (*w*) x ♂ *lozenge* (*lz*) F1 (♀ ≠ ♂) y F2 (♀ ≠ ♂)
- ♀ *lozenge* (*lz*) x ♂ *white* (*w*) F1 (♀ ≠ ♂) y F2 (♀ ≠ ♂)
- ♀ *lozenge* (*lz*) x ♂ *sepia* (*se*) F1 (♀ ≠ ♂) y F2 (♀ = ♂)
- ♀ *white* (*w*) x ♂ *yellow* (*y*) F1 (♀ ≠ ♂) y F2 (♀ ≠ ♂)
- ♀ *yellow* (*y*) x ♂ *white* (*w*) F1 (♀ ≠ ♂) y F2 (♀ ≠ ♂)

Genética UCM 2016

Pistas (F1)

- F1: ♀ y ♂ iguales y normales: El carácter recesivo (mutante) en ♀ NO está ligado al sexo (segmento diferencial del X).
- F1: ♀ y ♂ diferentes (♀ normales y ♂ mutantes como sus madres): El carácter recesivo (mutante) en ♀ SÍ está ligado al sexo.
- Del carácter en ♂ no se sabe nada hasta la F2.

Genética UCM 2016

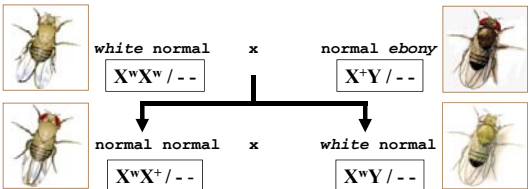
Pistas (F2)

- F1, ♀ y ♂ iguales y normales: El carácter en ♀ NO estaba ligado al sexo.
- F2, ♀ y ♂ iguales: El carácter en ♂ NO está ligado al sexo.
- F2, diferencias entre ♀ y ♂: El carácter en ♂ SÍ está ligado al sexo.
- F1, ♀ y ♂ diferentes (♀ normales y ♂ mutantes como sus madres): El carácter en ♀ SI estaba ligado al sexo.
- F2, ♀ y ♂ iguales: El carácter en ♂ NO está ligado al sexo.
- F2, diferencias entre ♀ y ♂: El carácter en ♂ SÍ está ligado al sexo.

Genética UCM 2016

Problema 1 (*w* x *e*)

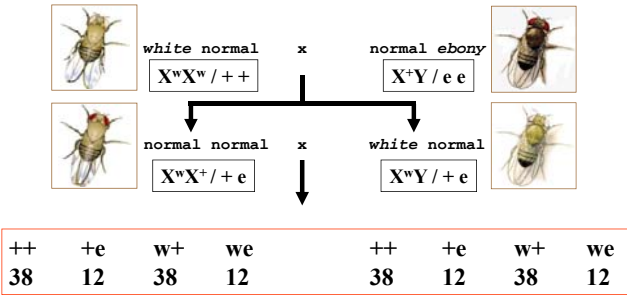
F1



Genética UCM 2016

Problema 1 (*w* x *e*)

F2



Genética UCM 2016

Problema 1 (w x e)

F2

F1		HEMBRAS							
MACHOS	GAMETOS	X ⁺	+	X ^w	+	X ⁺	e	X ^w	e
	X ^w +	X ^w X ⁺	++	X ^w X ^w	++	X ^w X ⁺	+e	X ^w X ^w	+e
	X ^w e	X ^w X ⁺	e+	X ^w X ^w	e+	X ^w X ⁺	ee	X ^w X ^w	ee
	Y +	YX ⁺	++	YX ^w	++	YX ⁺	+e	YX ^w	+e
	Y e	YX ⁺	e+	YX ^w	e+	YX ⁺	ee	YX ^w	ee

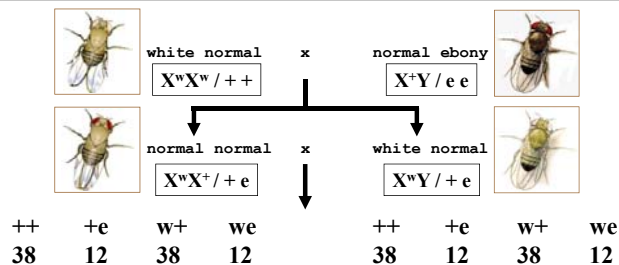
++	+e	w+	we	++	+e	w+	we
3/8	1/8	3/8	1/8	3/8	1/8	3/8	1/8
38	12	38	12	38	12	38	12



Genética UCM 2016

Problema 1 (w x e)

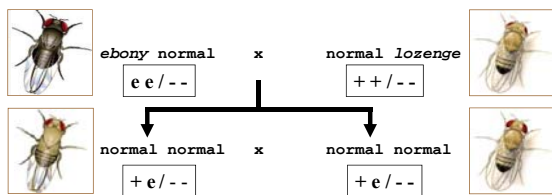
Mutantes *white* (w) y *ebony* (e) situados, respectivamente, en el segmento diferencial del cromosoma X y el cromosoma III



Genética UCM 2016

Problema 2 (e x lz)

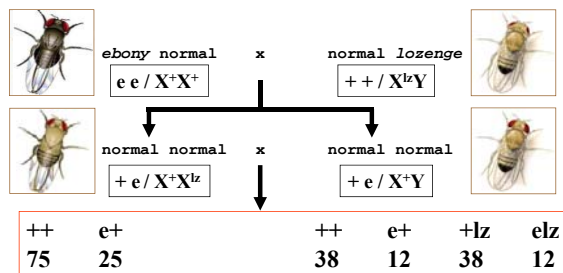
F1



Genética UCM 2016

Problema 2 (e x lz)

F2



Genética UCM 2016

Problema 2 (e x lz)

F2

F1		HEMBRAS							
MACHOS	GAMETOS	1/4 X ⁺ +	1/4 X ⁺ e	1/4 X^{lz} +	1/4 X^{lz} e	1/4 X ⁺ +	1/4 X ⁺ e	1/4 X^{lz} +	1/4 X^{lz} e
	X ⁺ +	X ⁺ X ⁺	++	X ⁺ X ⁺	+e	X ⁺ X^{lz}	++	X ⁺ X^{lz}	+e
	X ⁺ e	X ⁺ X ⁺	e+	X ⁺ X ⁺	ee	X ⁺ X^{lz}	e+	X ⁺ X^{lz}	ee
	Y +	YX ⁺	++	YX ⁺	+e	YX^{lz}	++	YX^{lz}	+e
	Y e	YX ⁺	e+	YX ⁺	ee	YX^{lz}	e+	YX^{lz}	ee

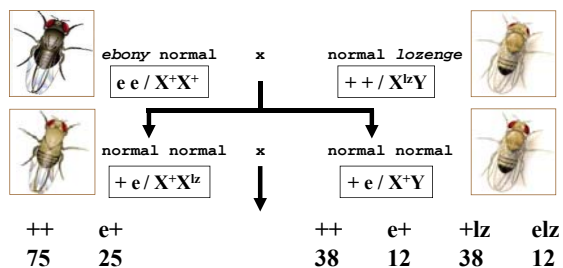
++	e+	++	e+	+lz	elz
3/4	1/4	3/8	1/8	3/8	1/8
75	25	38	12	38	12



Genética UCM 2016

Problema 2 (e x lz)

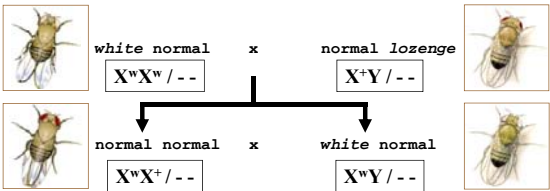
Mutantes *lozenge* (lz) y *ebony* (e) situados, respectivamente, en el segmento diferencial del cromosoma X y el cromosoma III



Genética UCM 2016

Problema 3 (w x lz)

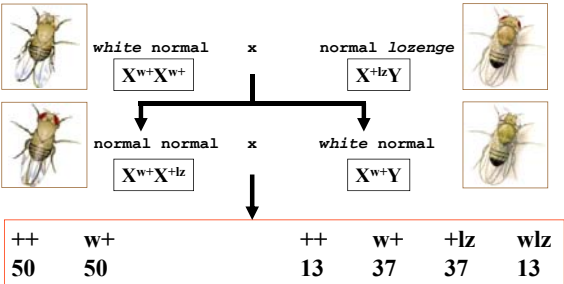
F1



Genética UCM 2016

Problema 3 (w x lz)

F2



Genética UCM 2016

Problema 3 (w x lz)

F2

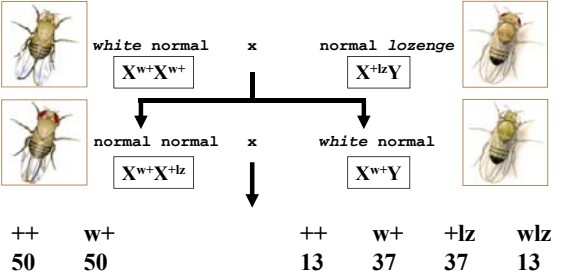
F1		HEMBRAS					
M A C H O S	GAMETOS	$X^{w+} \frac{1}{2}(1-p)$	$X^{+lz} \frac{1}{2}(1-p)$	$X^{++} \frac{1}{2}p$	$X^{w+} \frac{1}{2}p$	$X^{w+} \frac{1}{2}p$	$X^{w+} \frac{1}{2}p$
	X^{w+}	$X^{w+}X^{w+}$	$X^{w+}X^{+lz}$	$X^{w+}X^{++}$	$X^{w+}X^{w+}$	$X^{w+}X^{w+}$	$X^{w+}X^{w+}$
	Y	YX^{w+}	YX^{+lz}	YX^{++}	YX^{w+}	YX^{w+}	YX^{w+}
		++	w+	++	w+	+lz	wlz
		0,5	0,5	0,131	0,369	0,369	0,131
		50	50	13	37	37	13



Genética UCM 2016

Problema 3 (w x lz)

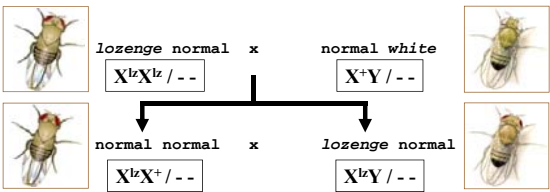
Mutantes *lozenge* (lz) y *white* (w) situados en el segmento diferencial del cromosoma X, a 26,2 Morgans de distancia.



Genética UCM 2016

Problema 4 (lz x w)

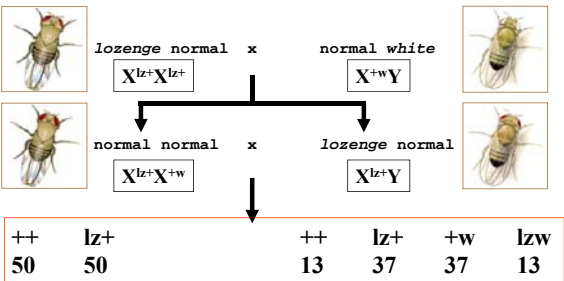
F1



Genética UCM 2016

Problema 4 (lz x w)

F2



Genética UCM 2016

Problema 4 (lz x w)

F2

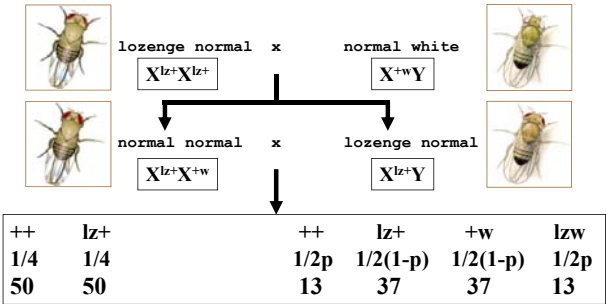
F1		HEMBRAS					
MACHOS	GAMETOS	$X^{+lz} \frac{1}{2}(1-p)$	$X^{W+} \frac{1}{2}(1-p)$	$X^{++} \frac{1}{2}p$	$X^{wlz} \frac{1}{2}p$		
	X^{+lz}	$X^{+lz} X^{+lz}$	$X^{+lz} X^{W+}$	$X^{+lz} X^{++}$	$X^{+lz} X^{wlz}$		
	Y	$Y X^{+lz}$	$Y X^{W+}$	$Y X^{++}$	$Y X^{wlz}$		
		++ 0,5 50	lz+ 0,5 50	++ 0,131 13	lz+ 0,369 37	+w 0,369 37	lwz 0,131 13



Genética UCM 2016

Problema 4 (lz x w)

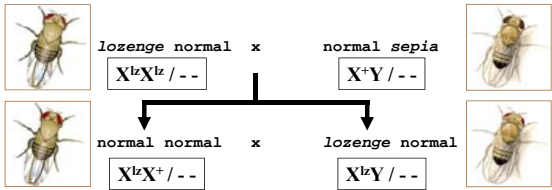
Mutantes *white* (w) y *lozenge* (lz) situados en el segmento diferencial del cromosoma X, a 26,2 Morgans de distancia.



Genética UCM 2016

Problema 5 (lz x se)

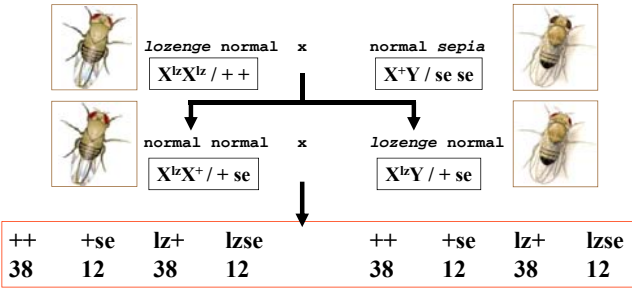
F1



Genética UCM 2016

Problema 5 (lz x se)

F2



Genética UCM 2016

Problema 5 (lz x se)

F2

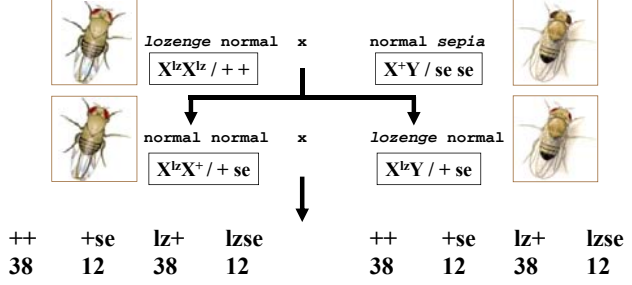
F1		HEMBRAS							
MACHOS	GAMETOS	$\frac{1}{4} X^{+} +$	$\frac{1}{4} X^{+} se$	$\frac{1}{4} X^{lz} +$	$\frac{1}{4} X^{lz} se$				
	$X^{lz} +$	$X^{lz} X^{+}$	++	$X^{lz} X^{+}$	+se	$X^{lz} X^{lz}$	++	$X^{lz} X^{lz}$	+se
	$X^{lz} se$	$X^{lz} X^{+}$	se+	$X^{lz} X^{+}$	sese	$X^{lz} X^{lz}$	se+	$X^{lz} X^{lz}$	ses e
	Y	$Y X^{+}$	++	$Y X^{+}$	+se	$Y X^{lz}$	++	$Y X^{lz}$	+se
		++	+se	lz+	se+	++	+se	lz+	se+
		3/8	1/8	3/8	1/8	3/8	1/8	3/8	1/8
		38	12	38	12	38	12	38	12



Genética UCM 2016

Problema 5 (lz x se)

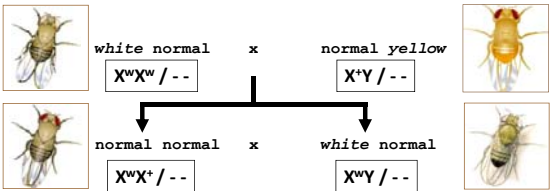
Mutantes *lozenge* (lz) y *sepia* (se) situados, respectivamente, en el segmento diferencial del cromosoma X y el cromosoma III



Genética UCM 2016

Problema 6 (w x y)

F1



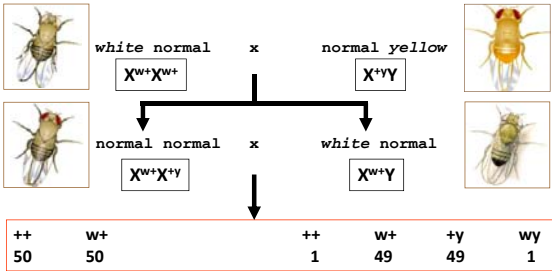
♀

♂

Genética UCM 2016

Problema 6 (w x y)

F2



♀

♂

Genética UCM 2016

Problema 6 (w x y)

F2

F1		HEMBRAS					
M A C H O S	GAMETOS	$X^{w+} \frac{1}{2}(1-p)$	$X^{+y} \frac{1}{2}(1-p)$	$X^{++} \frac{1}{2}p$	$X^{wy} \frac{1}{2}p$		
	X^{w+}	$X^{w+}X^{w+}$	$X^{w+}X^{+y}$	$X^{w+}X^{++}$	$X^{w+}X^{wy}$		
	Y	YX^{w+}	YX^{+y}	YX^{++}	YX^{wy}		

++	w+	++	w+	+y	wy
0,5	0,5	0,01	0,49	0,49	0,01
50	50	1	49	49	1

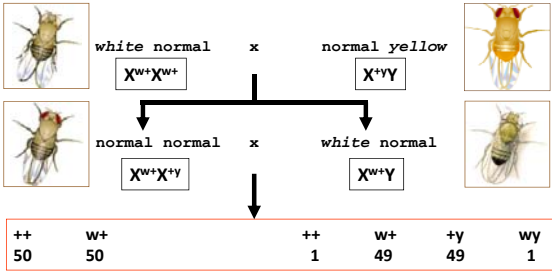
♀

♂

Genética UCM 2016

Problema 6 (w x y)

Los loci correspondientes a las mutaciones *white* (w) y *yellow* (y) están situados en el segmento diferencial del cromosoma X, a 1,5 Morgans de distancia.



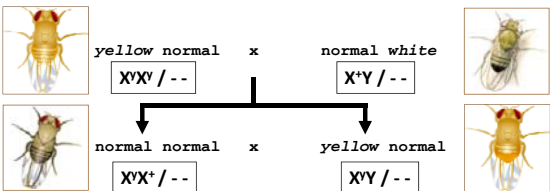
♀

♂

Genética UCM 2016

Problema 7 (y x w)

F1



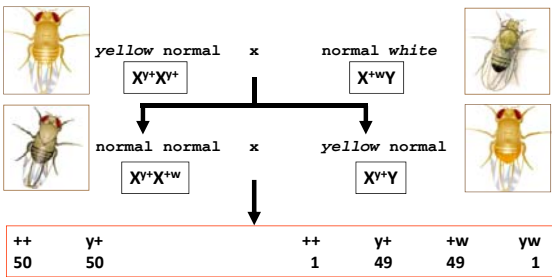
♀

♂

Genética UCM 2016

Problema 7 (y x w)

F2



♀

♂

Genética UCM 2016

Problema 7 (y x w)

F2

F1		HEMBRAS					
M A C H O S	GAMETOS	$X^{y+} \frac{1}{2}(1-p)$	$X^{+w} \frac{1}{2}(1-p)$	$X^{++} \frac{1}{2}p$	$X^{yw} \frac{1}{2}p$		
	X^{y+}	$X^{y+} X^{y+}$	$X^{y+} X^{+w}$	$X^{y+} X^{++}$	$X^{y+} X^{yw}$		
	Y	YX^{y+}	YX^{+w}	YX^{++}	YX^{yw}		
		++ 0,5 50	y+ 0,5 50	++ 0,01 1	y+ 0,49 49	+w 0,49 49	yw 0,01 1

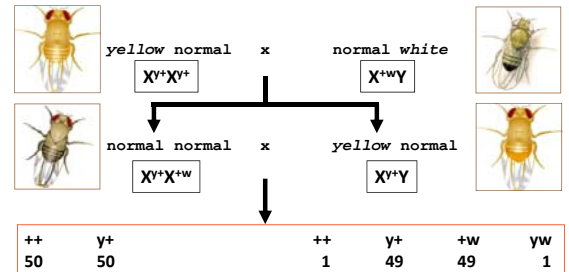
♀

♂

Genética UCM 2016

Problema 7 (y x w)

Los loci correspondientes a las mutaciones *yellow* (y) y *white* (w) están situados en el segmento diferencial del cromosoma X, a 1,5 Morgans de distancia.

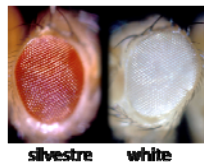


♀

♂

Genética UCM 2016

ANÁLISIS GENÓMICO DEL LOCUS *white*



Genética UCM 2016

Análisis genético de caracteres morfológicos en *Drosophila*

- Días 1 y 2: Problema de moscas

Análisis genómico del gen *white*

- Día 3: Extracción DNA
- Día 4: Valoración DNA y PCR
- Día 5: Visualización producto de PCR
- Día 6: Editar secuencia, comparar los dos alelos y localizar en el genoma



Genética UCM 2016

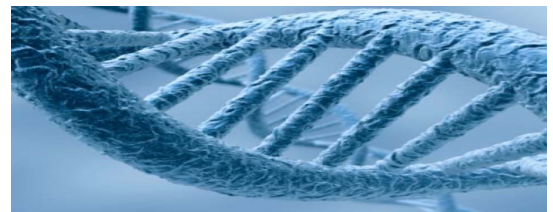
Material: *Drosophila melanogaster*



Genética UCM 2016

¿Qué vamos a hacer en el laboratorio?

Extracción de DNA
Valoración de DNA
PCR
Electroforesis
Análisis Bioinformático



Genética UCM 2016

TERCER DÍA: Extracción de ADN de *Drosophila melanogaster*

Extracción DNA



Vídeo DNA-Barcoding

<http://www.dnalc.org/view/16979-DNA-Barcoding.html>

Extracción de ADN de *Drosophila melanogaster*

• Metodología

1. Añadir 200 µl de tampón A. Homogeneizar en hielo.
2. Añadir otros 200 µl de tampón A. Acabar de homogeneizar en hielo.
3. Incubar 20-30 min a 65°C.
4. Añadir 800 µl de solución Li Cl/K acetato. Mezclar bien invirtiendo varias veces el tubo.
5. Centrifugar 15 min a la máxima velocidad (12.000-13.000 rpm). Pasar 900 µl de sobrenadante a un eppendorf limpio con **cuidado de no arrastrar nada del sedimento**. Si es necesario, volver a centrifugar.
6. Añadir 600 µl de isopropanol. Mezclar bien invirtiendo varias veces el tubo.
7. Centrifugar 15 min a 13.000 rpm. Eliminar el sobrenadante volcando el tubo **sin perder de vista el precipitado**.
8. Lavar con 500 µl etanol al 70% frío.
9. Centrifugar 5 min a máxima velocidad. Eliminar el sobrenadante aspirando con punta amarilla **con cuidado de no aspirar el sedimento**. Dejar evaporar las últimas trazas de etanol a temperatura ambiente con el tubo abierto.
10. Añadir 30 µl de H₂O.

CUARTO DÍA: Valoración del ADN y amplificación mediante PCR de un fragmento del gen *white*

Es preciso analizar el rendimiento y la calidad del ADN obtenido.

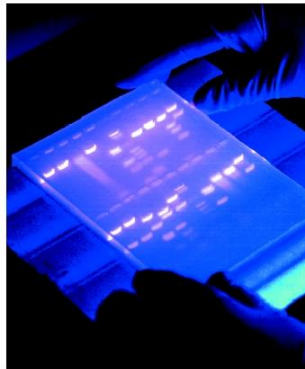
Esta valoración se puede llevar a cabo mediante dos metodologías: **electroforesis en gel de agarosa** y **espectrofotometría**.

Valorar un ADN significa determinar su **calidad** y su **cantidad**

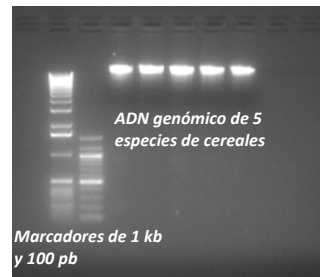
Valoración del ADN: EF en gel de agarosa

1. Electroforesis en geles de agarosa
2. Tinción
3. Iluminación con luz UV

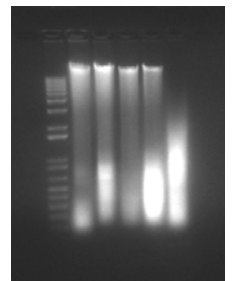
La intensidad de la banda es proporcional a la cantidad de ADN



Valoración del ADN: Electroforesis en gel de agarosa



ADN en buen estado

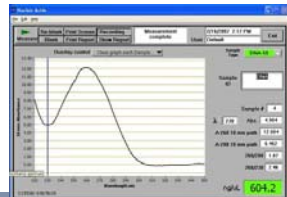


ADN en mal estado

Valoración DNA: espectrofotometría

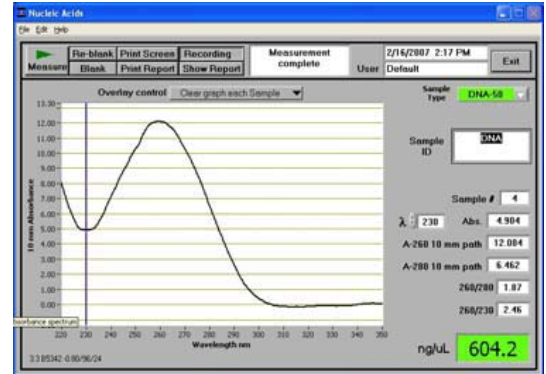
Cuantificación

- El ADN (las bases nitrogenadas) tiene un máximo de absorción a una longitud de onda de 260nm.
- Se puede utilizar esta propiedad para su valoración.
- Un valor de $A_{260nm} = 1$ corresponde a una concentración de 50 µg/ml de DNA bicatenario y de 40 µg/ml de DNA monocatenario o de RNA.



Genética UCM 2016

Valoración DNA: espectrofotometría



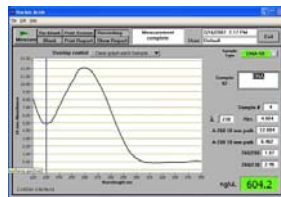
Genética UCM 2016

Valoración DNA: espectrofotometría

Calidad:

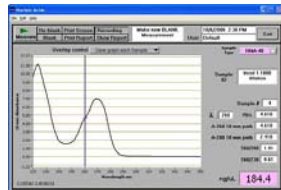
Pureza en espectrofotómetro

- Contaminación con proteínas relación 260/280
- Contaminación con carbohidratos o fenol relación 260/230



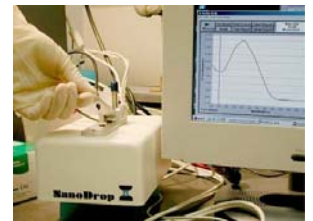
Integridad en gel de agarosa

- Fragmentación o degradación
- Presencia de ARN



Genética UCM 2016

Valoración DNA: espectrofotometría



cubeta

- Blanco
- Dilución apropiada de la muestra

Nanodrop: poca cantidad de muestra (1µl)

Genética UCM 2016

Valoración DNA: espectrofotometría

Metodología

- Encender el espectrofotómetro con antelación, ya que requiere que las lámparas estén calientes antes de ser utilizado.
- En una cubeta se preparará el blanco con agua destilada.
- Tomar 10 µl del ADN en estudio y diluirlo en 990 µl de agua. Se coloca la solución de ADN en la cubeta de cuarzo.
- Realizar la medición a 260 nm y a 280 nm.
- Calcular tanto la concentración de ADN en las muestras (µg/ml) como la cantidad total de ADN extraído (µg). Debe tenerse en cuenta que una OD (Densidad Óptica), medida a 260 nm, corresponde a 50 µg/ml de ADN de doble cadena. La proporción de la lectura a 260 y a 280 nm (260/280) proporciona una estimación de la pureza del ácido nucleico. Las preparaciones puras de ADN tienen una ratio 260/280 de 1,8.
- Dejar las muestras a una concentración de 200 ng/µl añadiendo la cantidad necesaria de agua destilada y estéril (en el caso de que sea necesario)..

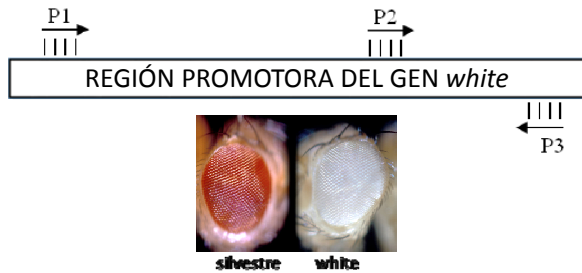
Genética UCM 2016

Amplificación por PCR del gen *white*



Genética UCM 2016

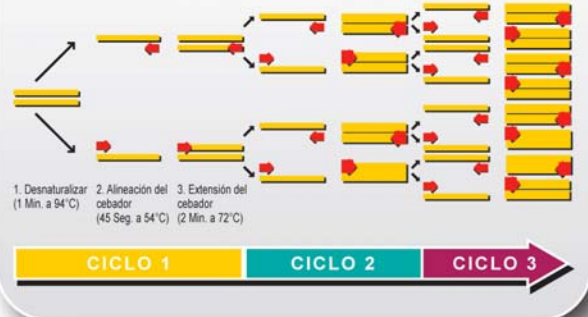
Amplificación por PCR del gen *white*



Genética UCM 2016

PCR

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA



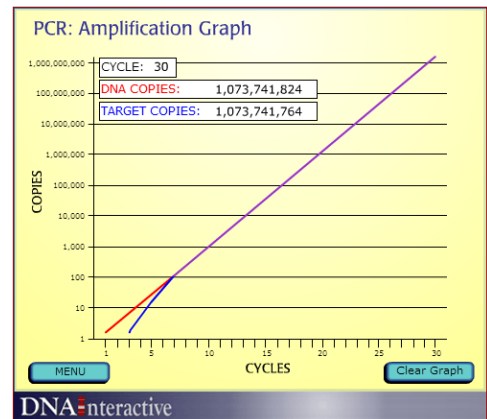
Genética UCM 2016

Animaciones sobre la PCR

- [Animación 3D de la PCR](#)
- [Esquema animado de la PCR](#)

Genética UCM 2016

Amplificación por PCR



Genética UCM 2016

Amplificación de un fragmento del gen *white* mediante PCR

1. Preparar la mezcla maestra de la reacción de amplificación:

Componentes	Cantidades por tubo	Cantidades por grupo
* Master mix (2x)	10 µl (1x)	200 µl
cebador P1 (5 µM)	1 µl (0,25 µM)	20 µl
cebador P2 (5 µM)	1 µl (0,25 µM)	20 µl
cebador P3 (5 µM)	1 µl (0,25 µM)	20 µl

*La master mix contiene tampón de reacción, $MgCl_2$, los diferentes dNTP y ADN polimerasa.

2. Se mezclan bien todos los componentes y se reparten 13 µl por cada tubo.
3. Cada equipo añade 7 µl de ADN molde (200 ng/µl).

Preparar una mezcla para cada grupo de 30 alumnos
Multiplicar por 20 (16-18 extracciones + 1 blanco sin ADN molde + errores de pipeteo)

Genética UCM 2016

Pasos del programa	Nº de ciclos	Temperatura	Duración
Desnaturalización	1	94°C	5 min
Hibridación	35	94°C	30 seg
Extensión		60°C	1 min
Extensión final	1	72°C	10 min
Conservación	1	4°C	∞



Genética UCM 2016

QUINTO DÍA: Electroforesis de la PCR

Genética UCM 2016

Electroforesis en gel de agarosa



Electroforesis en gel de agarosa del producto de la PCR

- *Preparación de un gel de agarosa al 1,5 % en tampón TAE.*
 - 1. Pesar la cantidad necesaria de agarosa para preparar un gel de 35 ml al 1,5 % (p/v).
 - 2. Mezclar la agarosa con 35 ml en tampón TAE (Tris, acético y EDTA).
 - 3. Fundir en el microondas la solución de agarosa, evitando que hierva.
 - 4. Sellar los bordes de la bandeja con cinta adhesiva y poner los peines.
 - 5. Cuando la solución de agarosa haya alcanzado una temperatura soportable por la mano agregar 35 μ l de SYBR Green (dilución final de la solución comercial 1:10.000).
 - 6. Servir el gel en la bandeja cuidando que no queden burbujas y que no se muevan los peines.
 - 7. Esperar a que la solución gelifique completamente.

Genética UCM 2016

Electroforesis en gel de agarosa



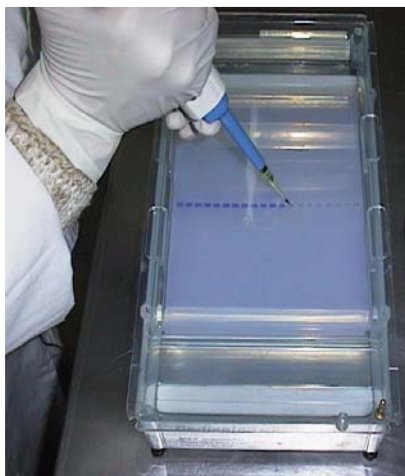
Electroforesis

- Se preparan las muestras para la electroforesis en un tubo eppendorf: 5 μ l de ADN, 3 μ l de agua destilada y 2 μ l de tampón de carga 5x.
- Se carga todo el volumen (10 μ l) en un pocillo del gel de agarosa. Simultáneamente a las muestras se cargará un marcador de peso molecular.
- Se desarrolla la electroforesis a 80 V durante 45-60 minutos.
- Se observa el resultado de la electroforesis en un transiluminador

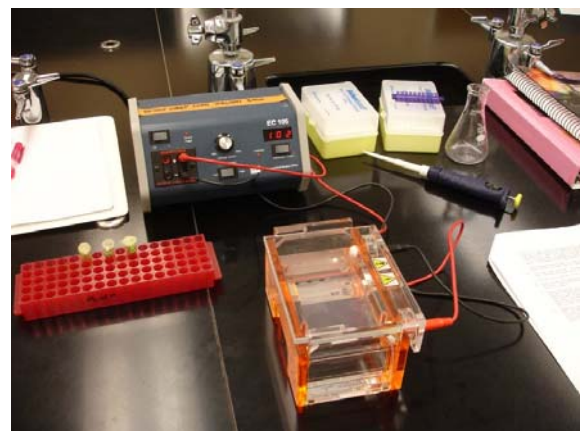
Genética UCM 2016



Genética UCM 2016



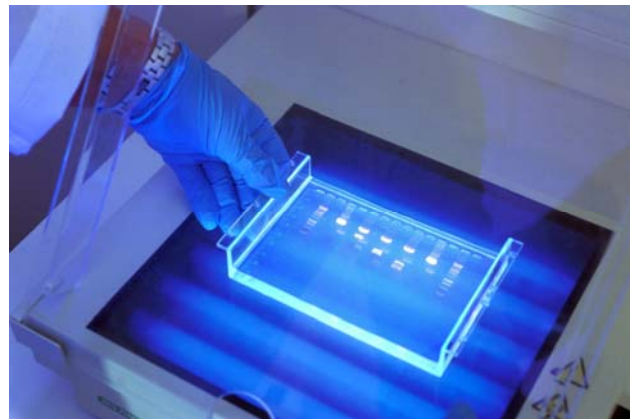
Genética UCM 2016



Genética UCM 2016



Genética UCM 2016



Genética UCM 2016

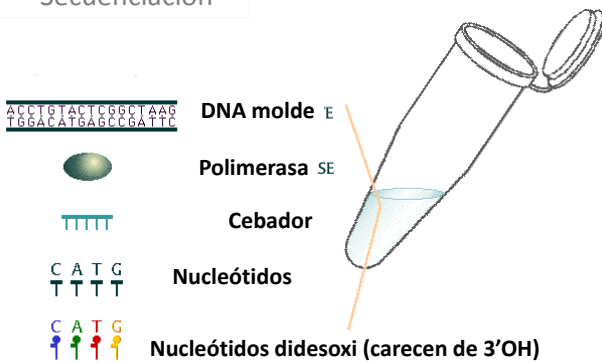
- El volumen restante de la **PCR** se puede enviar a la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid para su **secuenciación**. La secuencia del fragmento del gen white se determina en usando el **método de Sanger**.
- El envío de resultados se realiza por correo electrónico. Se recibe un archivo que contiene **la secuencia con extensión Ab1**. Los archivos Ab1 pueden abrirse con diversos programas de análisis de secuencias o con visores gratuitos.
- Mientras se lleva a cabo la electroforesis vamos a ver la metodología para la secuenciación de un fragmento de ADN.

Genética UCM 2016

Secuenciación de DNA

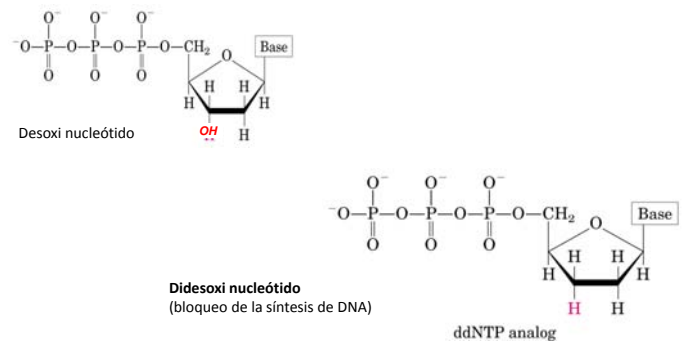
Genética UCM 2016

Secuenciación

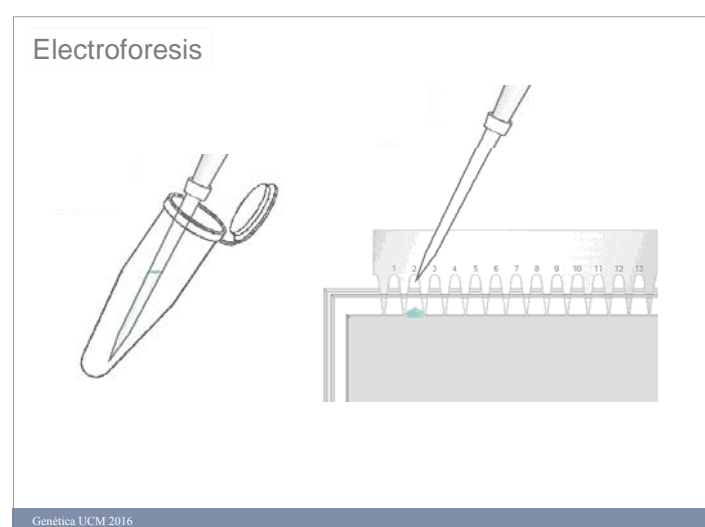
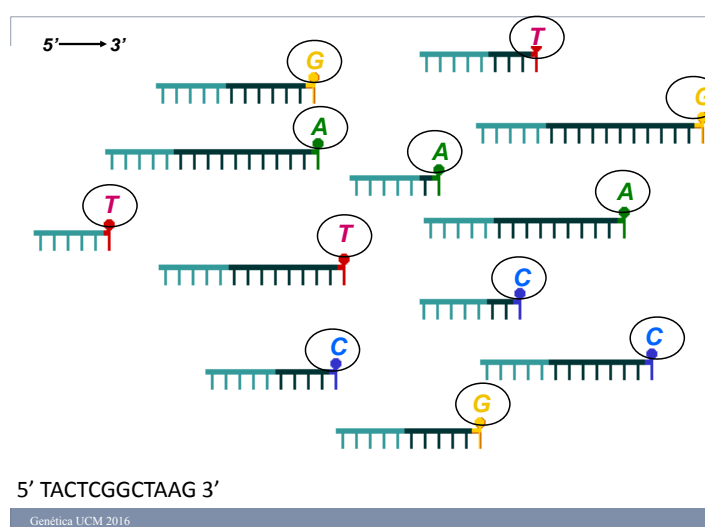
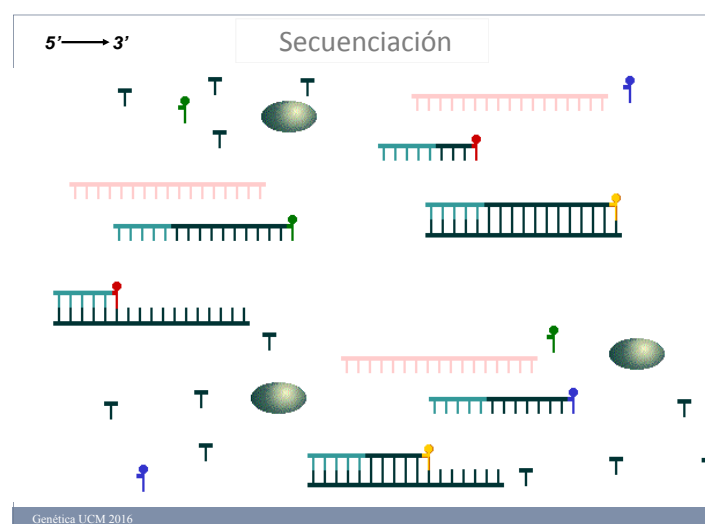
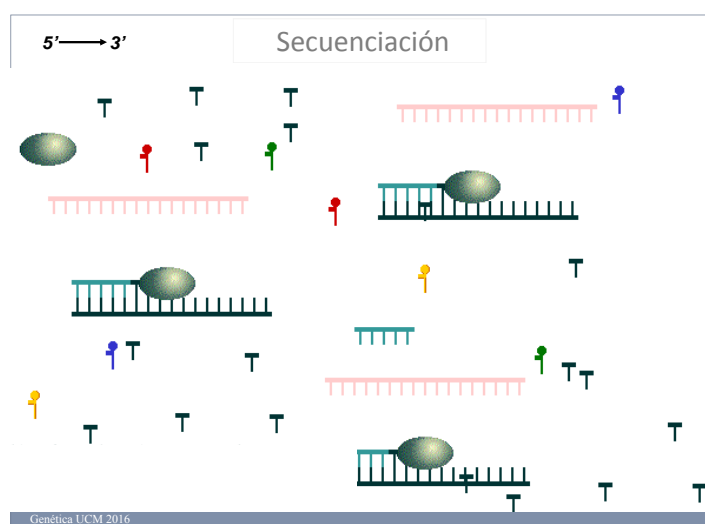
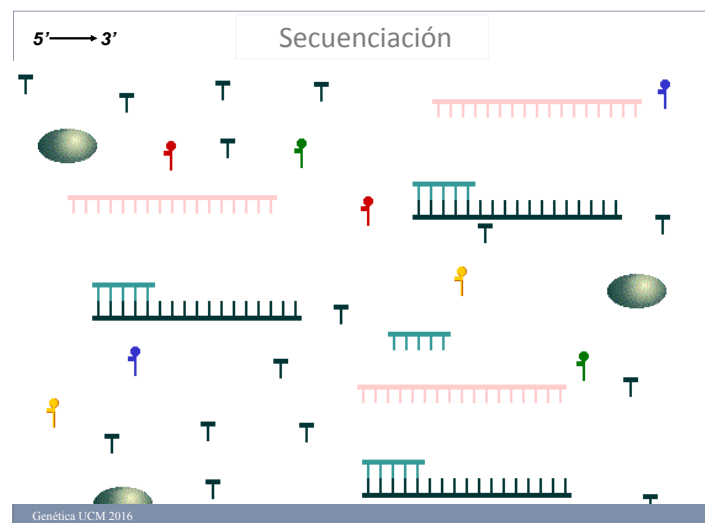
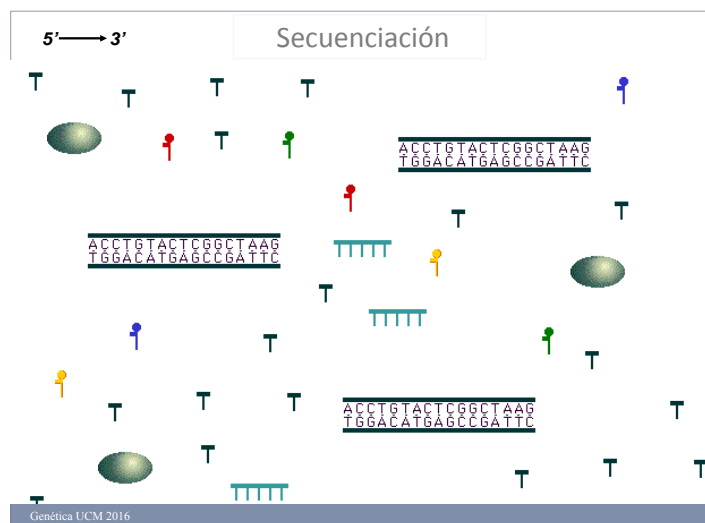


Genética UCM 2016

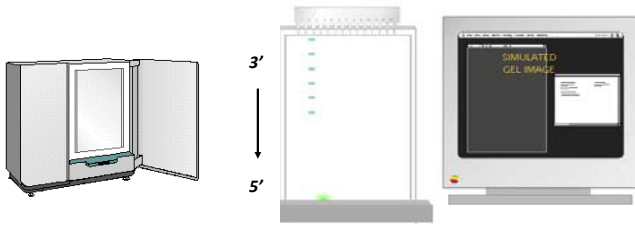
Secuenciación



Genética UCM 2016



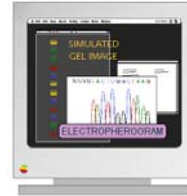
Electroforesis



Los fragmentos comienzan a migrar y cuando alcanzan la posición del láser, éste excita el fluorocromo de cada uno de los fragmentos de DNA y la señal emitida es recogida por cada uno de los detectores situados en la parte posterior del gel.

Las señales se digitalizan y se envían al ordenador

Genética UCM 2016



Los secuenciadores automáticos generan una serie de picos de distintos colores (un color para cada base), que corresponden al resultado de la reacción de secuenciación. Esta información está contenida en el **cromatograma**.

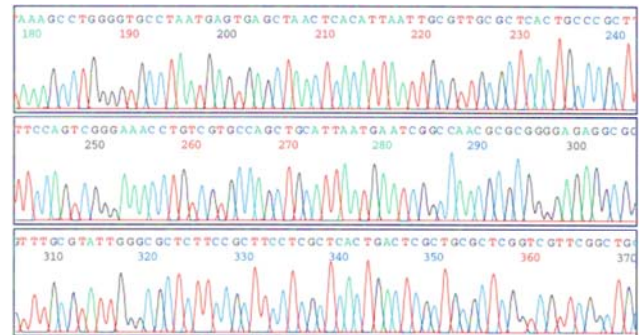
Genética UCM 2016

Animaciones sobre secuenciación

- [Animación 3D del método de Secuenciación de Sanger](#)
- [Esquema animado del método de Secuenciación de Sanger](#)

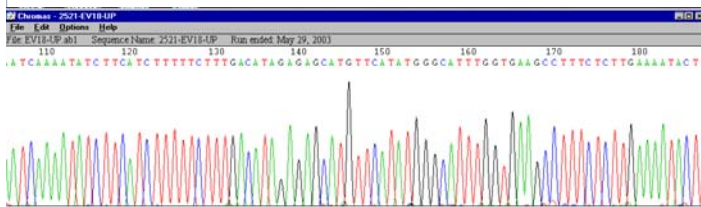
Genética UCM 2016

El cromatograma contiene la interpretación que realiza el software de esos picos, en forma de una secuencia de ADN



Genética UCM 2016

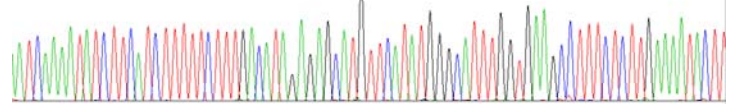
Interpretación de los cromatogramas



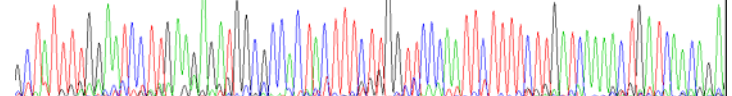
Genética UCM 2016



Sin ruido de fondo



Ligero ruido de fondo



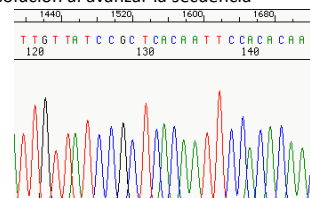
Genética UCM 2016



Pérdida de resolución.

Las secuencias pierden resolución al avanzar la secuencia

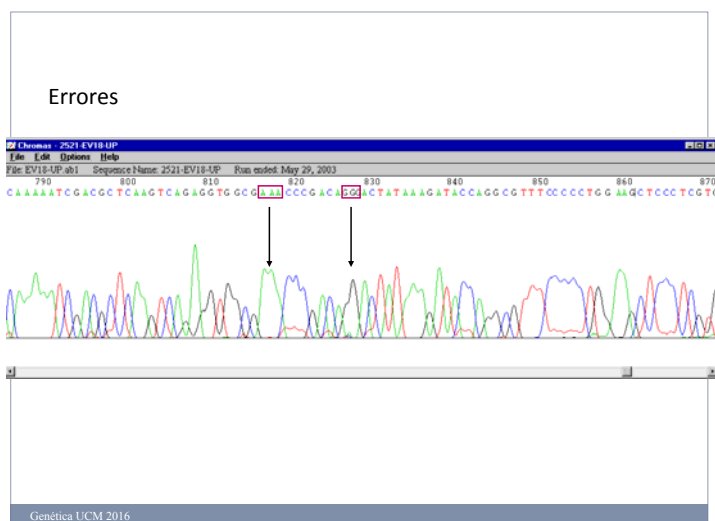
Buena resolución



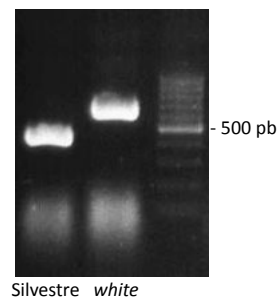
i C C A G T T A C C T T C G H A A A A G A G T T G G T

970 980 990

Resolución mala



Resultado de la PCR



Genética UCM 2016

Genotipado



- ¿Qué aspecto tendría la amplificación de un individuo heterocigoto de la F2?
- Esta misma metodología se emplea en muchos casos para el diagnóstico de enfermedades

Genética UCM 2016

SEXTO DÍA: Análisis de la secuencia del gen *white* y su localización en el genoma de *Drosophila melanogaster*

- Editado de secuencias
- Comparación en bases de datos
- Alineamiento de las secuencias de las dos cepas de moscas (silvestre y *white*)
- Análisis de genomas. Localización de la secuencia obtenida en el genoma de *Drosophila melanogaster*
- Análisis de genomas. Localización de otros loci en el genoma de *Drosophila melanogaster*
- Comparación con el mapa genético

Genética UCM 2016

Edición



Genética UCM 2016

Abrir el cromatograma con Chromas



Genética UCM 2016

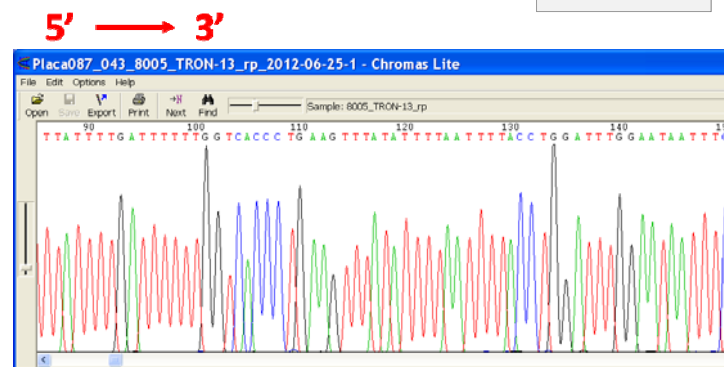
Comprobación los cromatogramas

¿Tiene señal? ¿Se ven picos o es todo ruido?

¿Dónde comienza la región de buena calidad? ¿Dónde termina?

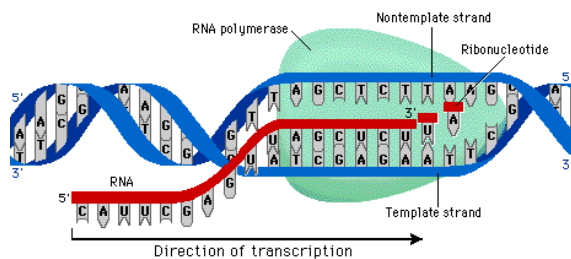
Genética UCM 2016

Edición



Genética UCM 2016

Siempre, la síntesis de un ácido nucleico se produce en sentido **5' → 3'**



Genética UCM 2016

PCR

3' A G C A T A C A A T G G C C C T T T T A T C 5'
5' T C G T A T G T T A C C G G G A A A A T A G 3'

Primers

Forward 5' G T A T G T 3'

Reverse 5' A T T T T C 3'

Genética UCM 2016

PCR

3' A G C A T A C A A T G G C C C T T T T A T C 5'

5' T C G T A T G T T A C C G G G A A A A T A G 3'

Primers

Forward 5' G T A T G T 3'

Reverse 5' A T T T T C 3'

Genética UCM 2016

PCR

5' G T A T G T →

3' A G C A T A C A A T G G C C C T T T T A T C 5'

5' T C G T A T G T T A C C G G G A A A A T A G 3'

Primers

Forward 5' G T A T G T 3'

Reverse 5' A T T T T C 3'

Genética UCM 2016

SECUENCIACIÓN

5' G T A T G T →

3' A G C A T A C A A T G G C C C T T T T A T C 5'

5' T C G T A T G T T A C C G G G A A A A T A G 3'

← C T T T T A 5'

**Se pueden hacer 2 reacciones de
secuenciación independientes**

Genética UCM 2016

RESULTADOS DE LA SECUENCIACIÓN

5' G T A T G T T A C C G G G A A A A T A G 3'

3' A G C A T A C A A T G G C C C T T T T A T C 5'

5' T C G T A T G T T A C C G G G A A A A T A G 3'

3' A G C A T A C A A T G G C C C T T T T A 5'

**Se obtiene el resultado de la secuencia
para cada hebra**

Genética UCM 2016

RESULTADO DE LA SECUENCIACIÓN

5' G T A T G T T A C C G G G A A A A T A G 3'

3' A G C A T A C A A T G G C C C T T T T A T C 5'

En este caso sólo hemos realizado una de ellas

Genética UCM 2016

EDITADO DE LA SECUENCIACIÓN

5' G T A T G T T A C C G G G A A A A T A G 3'

3' A G C A T A C A A T G G C C C T T T T A T C 5'

Para editar una secuencia:

- 1) Comprobar la calidad
- 2) Buscar los cebadores de la PCR para comprobar que hemos secuenciado el fragmento correcto

Genética UCM 2016

EDITADO DE LA SECUENCIACIÓN

5' **G T A T G T** T A C C G G G A A A A T A G 3'

- Buscar los cebadores de la PCR para comprobar que hemos secuenciado el fragmento correcto
- Para localizar el cebador *Reverse* hay que obtener la secuencia reversa y complementaria

Primers

Forward 5' **G T A T G T** 3'

Reverse 5' **A T T T T C** 3'

Genética UCM 2016

EDITADO DE LA SECUENCIACIÓN

5' **G T A T G T** T A C C G G G A A A A T A G 3'

La secuencia complementaria

3' C A T A C A A T G G C C C T T T T A T C 5'

Primers

Forward 5' **G T A T G T** 3'

Reverse 5' **A T T T T C** 3'

Genética UCM 2016

EDITADO DE LA SECUENCIACIÓN

5' **G T A T G T** T A C C G G G A A A A T A G 3'

La secuencia complementaria

3' C A T A C A A T G G C C C T T T T A T C 5'

La reversa de la complementaria

5' C T A T T T T C C C G G T A A C A T A C 3'

Primers

Forward 5' **G T A T G T** 3'

Reverse 5' **A T T T T C** 3'

Genética UCM 2016

EDITADO DE LA SECUENCIACIÓN

5' **G T A T G T** T A C C G G G A A A A T A G 3'

La secuencia complementaria

3' C A T A C A A T G G C C C T T T T A T C 5'

La reversa de la complementaria

5' C T **A T T T T C** C C G G T A A C A T A C 3'

Primers

Forward 5' **G T A T G T** 3'

Reverse 5' **A T T T T C** 3'

Genética UCM 2016

EDITADO DE LA SECUENCIACIÓN

5' **G T A T G T** T A C C G G **G A A A A T** A G 3'

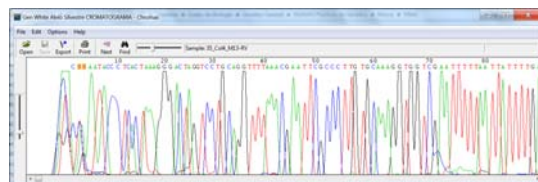
En la práctica lo que se hace es buscar la secuencia reversa y complementaria del primer *Reverse* en la hebra secuenciada

Primer Reverse

5' ATTTTC3' → 3' TAAAAG5' → 5' **GAAAAT**3'

Genética UCM 2016

Buscar en la secuencia abierta con Chromas los cebadores de la PCR

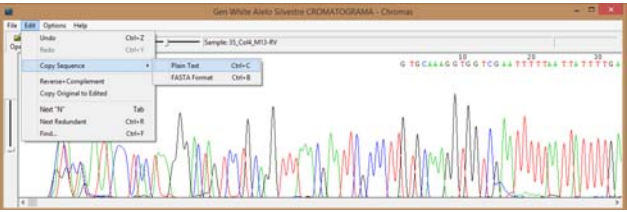


Alelo white en la cepa silvestre

Cebador	Secuencia (5' → 3')
P1	GTGCAAAGGTGGTCAATTT
P3	GAGAGGAGTTTGGCACAGC

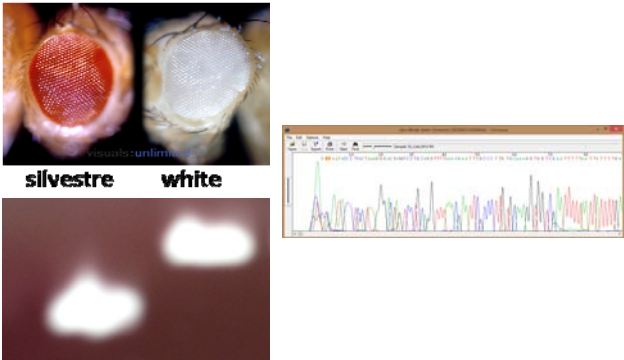
Genética UCM 2016

Copiar/guardar la secuencia editada en un archivo de texto



Genética UCM 2016

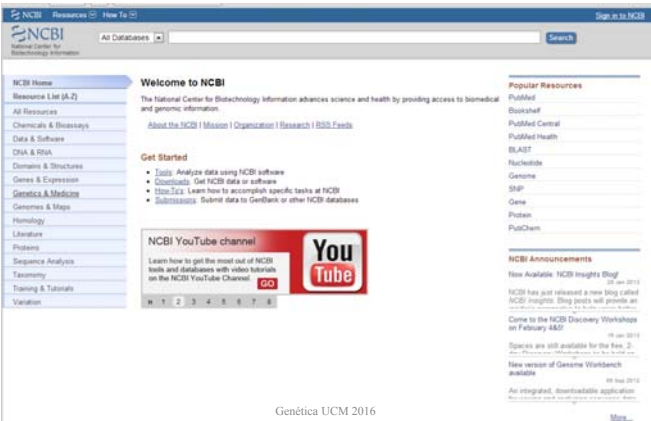
ANÁLISIS GENÓMICO DEL LOCUS *white*



Genética UCM 2016

Comparación en las bases de datos

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



Genética UCM 2016

Comparación en las bases de datos

BLAST es una herramienta para encontrar secuencias homólogas en una base de datos



BLAST

Genética UCM 2016

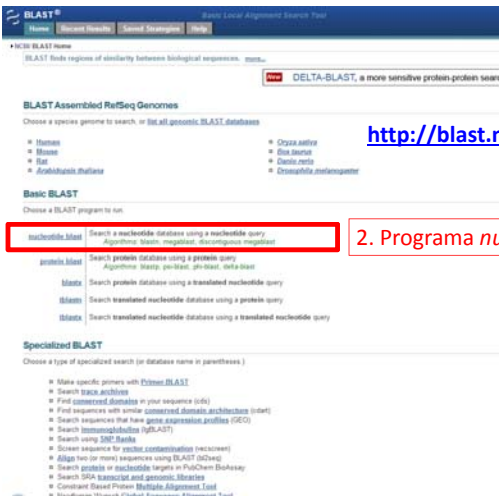
1. Secuencia

BLAST



>Gen white Alelo Silvestre CROMATOGRAMA.ab1
GTGCAAGGTGGTCGAATTTTAATTATTTTGAACGGAACACATTAGCTAAACATAAACA
TGTTGTCACTAGTATGTAAGTAAATAAAACCCCTTTTGGAGAATGTAGATTTAAA
AAACATATTTTATTTTATTTTACTGCACTGGACATCATTGAACCTTATCTGATCAGT
TTTAAATTTACTTCGATCCAAAGGTATTGAAGTACCAGGTTCTTTCGATTACCTCTCAC
TCAAAATGACATTCCTCAAGTCAGCGCTGTTTGCCCTCCTCTCTGTCCACAGAAATA
TCGCGGTCTCTTTCGCGCGTCCGTCGCTATCTCTTTCGCCACCGTTTGTAGCGTTACCT
AGCGTCAATGTCGCGCTTCAGTTGCACCTTTGTGACGCGTTTCGTGACGAAGCTCCAAGCG
GTTTACGCCATCAATTAACACAAAGTGCTGTGCCAAACCTCCTCTCT

Genética UCM 2016



BLAST

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

2. Programa nucleotide blastn

Genética UCM 2016

BLAST

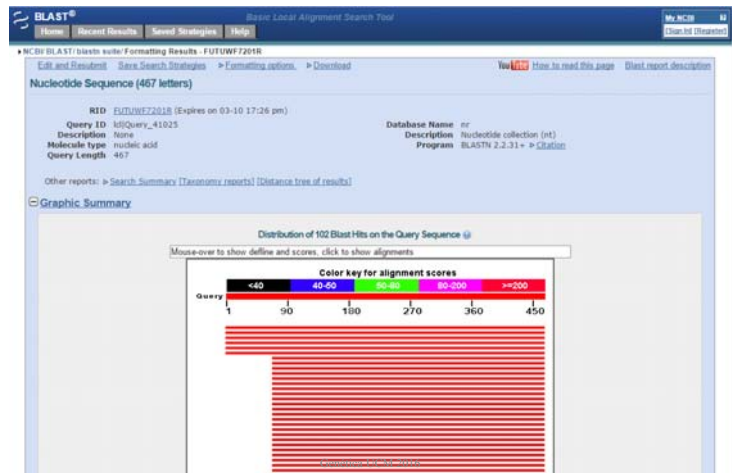
Pegar

Introducir la secuencia problema (query), usando la opción de copiar y pegar

Genética UCM 2016

NCBI BLAST RESULTADOS: Los posibles homólogos

BLAST



NCBI BLAST RESULTADOS: Los posibles homólogos

BLAST

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

Alignments Download - GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Drosophila melanogaster white locus	863	863	100%	0.0	100%	X02974.2
Drosophila melanogaster chromosome X	761	761	100%	0.0	96%	AE014298.5
TPA Drosophila melanogaster HOC17173 (HOC17173) gene, complete cds	761	761	100%	0.0	96%	BE002985.1
Drosophila melanogaster X BAC RP98-3403 (Roswell Park Cancer Institute Drosophila BAC Library) complete sequence	761	761	100%	0.0	96%	AC104148.5
Drosophila melanogaster X BAC RP98-3081 (Roswell Park Cancer Institute Drosophila BAC Library) complete sequence	761	761	100%	0.0	96%	AL133596.2
Drosophila melanogaster BAC clone BACN0381	761	761	100%	0.0	96%	AL133596.2
Transformation vector pDR-H2.7 Yellow H-Pelican, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	D682199.1
Transformation vector pDR-H2.7 Yellow H-Pelican, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	D682199.1
Yellow H-Pelican Drosophila transposon vector, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	AY730637.1
Cloning vector pElement XP, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	AY151548.1
Cloning vector pElement XP, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	AY151548.1
Cloning vector pElement XP, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	AY151548.1
UAS-Red Stringer Df(1)N-S Drosophila UAS-RF transformation vector, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	AY490568.1
UAS-Red Stringer GFP transformation vector, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	AF242962.2
Red H-Pelican Df(1)N-S transformation vector, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	AY342438.1
Red H-Pelican Df(1)N-S transformation vector, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	AY342438.1
Yellow H-Pelican YFP transformation vector, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	AY381252.1
P-element transformation vector pF140, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	AY316513.1
Transformation vector pFRT, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	AY268481.1
P-element cloning system vector pF140-homolog, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	AY324837.1
P-element cloning system vector pF140-homolog, complete sequence	737	737	85%	0.0	100%	AY324837.1

Genética UCM 2016

NCBI BLAST RESULTADOS: Los posibles homólogos

BLAST

Alignments

Download - GenBank Graphics

Drosophila melanogaster white locus

Sequence ID: gmb202574.2 Length: 14247 Number of Matches: 1

Range	Score	Expect	Identifiers	Score	Ident	Pos/Pos
863-863(467)	0.0	467/467(100%)	467/467(100%)	0.0	467/467(100%)	467/467(100%)

Query 1: GTCCAGAGTGTGCAATTTTATTTATTTTGAACGACACATTTACCAATCAACA 60
 Subject 7130: GTCCAGAGTGTGCAATTTTATTTATTTTGAACGACACATTTACCAATCAACA 7130

Query 41: TTTTCTCAGTAT 120
 Subject 7130: TTTTCTCAGTAT 120

Query 321: AAAACAT 180
 Subject 7251: AAAACAT 180

Query 181: TTTTAAATTTCTGATCCAAAGTATTTGAATACCAAGTATTTCTGATACCTTCA 240
 Subject 7313: TTTTAAATTTCTGATCCAAAGTATTTGAATACCAAGTATTTCTGATACCTTCA 240

Query 7313: TTTTAAATTTCTGATCCAAAGTATTTGAATACCAAGTATTTCTGATACCTTCA 240
 Subject 7313: TTTTAAATTTCTGATCCAAAGTATTTGAATACCAAGTATTTCTGATACCTTCA 240

Query 241: TCAAAATGACATTCATCAAAATGACATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTC 300
 Subject 7371: TCAAAATGACATTCATCAAAATGACATTCATTCATTCATTCATTCATTCATTC 300

Query 391: TCCGCTCTCTTCCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 360
 Subject 7431: TCCGCTCTCTTCCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 360

Query 7431: TCCGCTCTCTTCCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 360
 Subject 7431: TCCGCTCTCTTCCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 360

Query 361: AAGCTCAATGCTCCCTCTCAATTCATTTCTCAAGCTTTCTGACCAATCAAG 420
 Subject 7491: AAGCTCAATGCTCCCTCTCAATTCATTTCTCAAGCTTTCTGACCAATCAAG 420

Query 7491: AAGCTCAATGCTCCCTCTCAATTCATTTCTCAAGCTTTCTGACCAATCAAG 420
 Subject 7491: AAGCTCAATGCTCCCTCTCAATTCATTTCTCAAGCTTTCTGACCAATCAAG 420

Query 421: GTTACGCTCATCAATTAACCAAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 480
 Subject 7551: GTTACGCTCATCAATTAACCAAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 480

Alineamiento de las secuencias de los dos alelos (rojo y white)

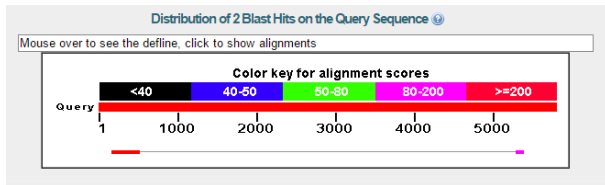
programa Align del NCBI (bl2seq).

Genética UCM 2016

Alineamiento de las secuencias de los dos alelos (rojo y white)

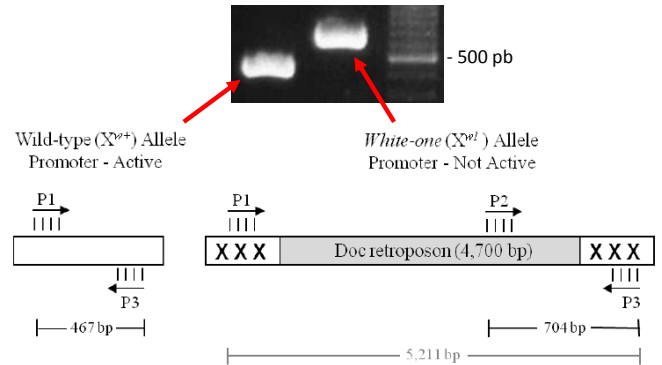
Introducir las secuencias usando la opción de copiar y pegar:
 1º el archivo de texto (Gen white Alelo white TEXTO)
 2º el archivo de texto que hemos generado a partir del cromatograma (Gen white Alelo Silvestre CROMATOGRAMA)

Genética UCM 2016



Genética UCM 2016

Alineamiento de las secuencias de los dos alelos (rojo y *white*)



Genética UCM 2016

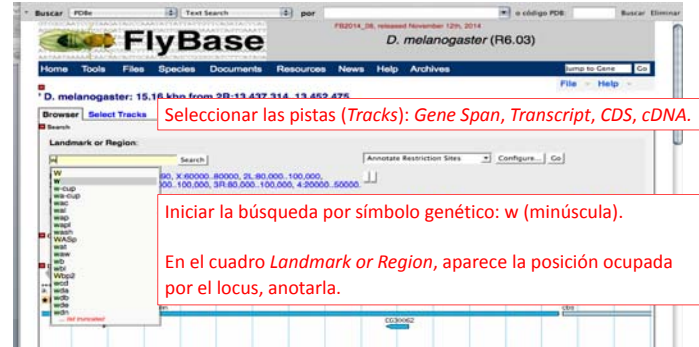
Análisis de genomas. Localización de la secuencia obtenida en el genoma de *Drosophila melanogaster*



Ir a la aplicación **GBrowse** desde la página de *Drosophila* (<http://flybase.org/>)

Genética UCM 2016

Análisis de genomas. Localización de la secuencia obtenida en el genoma de *Drosophila melanogaster*



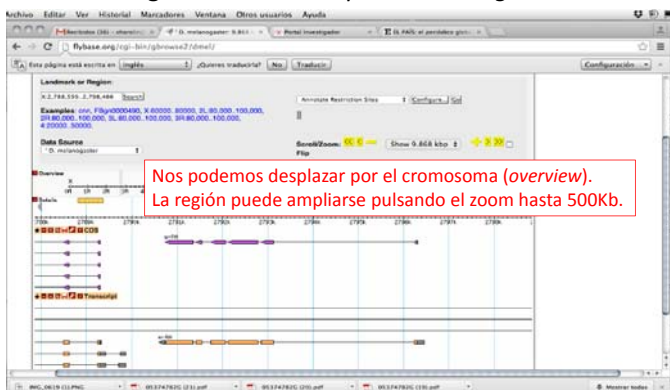
Seleccionar las pistas (Tracks): *Gene Span*, *Transcript*, *CDS*, *cDNA*.

Iniciar la búsqueda por símbolo genético: *w* (minúscula).

En el cuadro *Landmark or Region*, aparece la posición ocupada por el locus, anotarla.

Genética UCM 2016

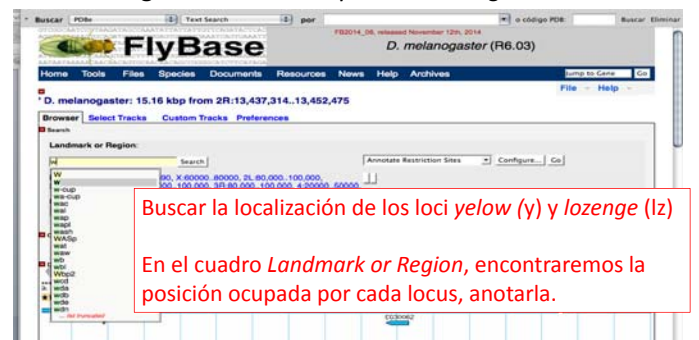
Análisis de genomas. Localización de la secuencia obtenida en el genoma de *Drosophila melanogaster*



Nos podemos desplazar por el cromosoma (*overview*). La región puede ampliarse pulsando el zoom hasta 500Kb.

Genética UCM 2016

Análisis de genomas. Localización de otros genes en el genoma de *Drosophila melanogaster*



Buscar la localización de los loci *yellow* (*y*) y *lozenge* (*lz*)

En el cuadro *Landmark or Region*, encontraremos la posición ocupada por cada locus, anotarla.

Genética UCM 2016

Comparación de la distancia genética con la distancia física en una región del genoma de *Drosophila melanogaster*

